



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Análise da expressão e função dos recetores de compostos amargos no plexo coroide: estudo da resposta ao resveratrol

José Alberto Canário dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Isabel Maria Theriaga Mendes Varanda Gonçalves
Co-orientador: Prof^a. Doutora Cecília Reis Alves Santos

Covilhã, junho de 2018

Agradecimentos

Para a realização desta dissertação, contei com o apoio imprescindível de múltiplas pessoas às quais estou profundamente grato.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, irmãs e cunhado por toda a compreensão, disponibilidade e atenção que me dedicaram durante estes anos.

À minha orientadora Professora Doutora Isabel Gonçalves, pela orientação prestada, pelo incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou.

À minha coorientadora Professora Doutora Cecília Santos, pela oportunidade de trabalhar neste projeto.

À Doutora Helena Marcelino, Joana Tomás e Doutora Telma Quintela, pelo apoio e por todos os ensinamentos demonstrados nas atividades laboratoriais.

Às alunas de doutoramento Catarina Duarte, Ana Costa, Ana Brito e Daniela Talhada pelo apoio e disponibilidade que sempre demonstraram ao longo deste percurso. Um agradecimento especial à Catarina Duarte, pelo apoio, disponibilidade e paciência na elaboração deste projeto.

Ao meu colega e amigo, Duarte Rocha, pela amizade, apoio, disponibilidade e compreensão.

A todos os meus amigos que contribuíram ou auxiliaram na elaboração deste projeto, pela paciência, atenção e força que prestaram em momentos menos fáceis.

Este trabalho foi parcialmente apoiado pelo “Programa Operacional do Centro, Centro 2020” através do financiamento do projeto ICON (Interdisciplinary Challenges On Neurodegeneration; CENTRO-01-0145-FEDER-000013). ”.

Resumo

O plexo coroide (CP) é uma estrutura altamente vascularizada, localizada nas cavidades ventriculares cerebrais, que forma a barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (BSLCR), uma das barreiras protetoras do cérebro. Das inúmeras funções desempenhadas por esta estrutura, destaca-se a secreção do LCR e a regulação da passagem de moléculas entre a corrente sanguínea e o LCR. Recentemente, foi descrita a presença da via de sinalização do paladar no CP de rato, o que levanta a possibilidade de que esta via possa estar também envolvida na detecção e regulação da concentração dos compostos que circulam no LCR e no sangue, fazendo parte do mecanismo de vigilância química do CP. Propomos que os TAS2R presentes no CP possam ter um papel ativo na regulação da composição química do sangue e do LCR, que ao reconhecerem os seus ligandos possam desencadear respostas a jusante, que poderão passar pela regulação dos transportadores de efluxo presentes na BSLCR. Este trabalho teve como principais objetivos a análise da expressão de recetores do paladar no CP humano, em particular os recetores de compostos amargos (TAS2R), e a avaliação dos efeitos da sua ativação pelo resveratrol, um conhecido ligando dos recetores TAS2R14 e TAS2R39, na função de alguns transportadores de efluxo, presentes na barreira sangue-LCR.

Com este projeto detetámos transcritos de 13 TAS2Rs (TAS2R3, TAS2R4, TAS2R5, TAS2R8, TAS2R10, TAS2R13, TAS2R14, TAS2R39, TAS2R40, TAS2R41, TAS2R44, TAS2R48 e TAS2R50), de uma molécula efetora da via de sinalização do paladar (TrpM5) e de três transportadores de efluxo (ABCB1, ABCC1 e ABCC4) numa linha celular de células epiteliais de CP humano (HIBCPP), por RT-PCR. Analisámos a expressão proteica de cinco destes 13 recetores amargos (TAS2R4, TAS2R5, TAS2R10, TAS2R14 e TAS2R39), por *Western Blot* e imunocitoquímica. A funcionalidade dos recetores TAS2R14 e TAS2R39 foi avaliada por *calcium imaging*, por estimulação das células de CP com resveratrol, descrito como ligando destes TAS2R. O silenciamento dos recetores com siRNAs específicos para TAS2R14 e TAS2R39, demonstrou uma diminuição da resposta por parte das células, após estimulação com resveratrol, destacando o papel destes recetores na resposta ao resveratrol. Analisámos também a funcionalidade de um dos transportadores de efluxo em células HIBCPP e a sua capacidade em adquirirem uma conformação de barreira, tendo otimizado protocolos para os ensaios de *uptake*, de permeabilidade e medição da resistência transepitelial (TEER). Nesta fase, temos os protocolos otimizados, por forma a realizar experiências que nos permitirão concluir quanto à possível regulação dos transportadores de efluxo pela ativação dos recetores TAS2R.

Palavras-chave

Paladar, Plexo coroide, Recetores do paladar, Resveratrol, Transportadores

Abstract

The choroid plexus (CP) is a highly vascularized structure located in the cerebral ventricular cavities, which forms the blood-CSF barrier (BCSFB), one of the protective barriers of the brain. Of the numerous functions performed by this structure, the secretion of CSF stands out, along with the regulation of the passage of molecules between the blood stream and the CSF. Recently, the presence of the taste signaling pathway in mice CP, raising the possibility that this pathway may also be involved in the detection and regulation of the concentration of compounds that circulate in the CSF and in the bloodstream, being part of the CP's chemical surveillance mechanism. We propose that the TAS2R present in the CP may have an active role in the regulation of the chemical composition of blood and CSF, that by recognizing their ligands they may trigger downstream responses, which may consist in the regulation of efflux transporters present in the BCSFB. This work had as the main objectives the analysis of the expression of taste receptors in the human CP, particularly the bitter taste receptors (TAS2R) and the evaluation of the effects of its activation by resveratrol, a known ligand of the receptors TAS2R14 and TAS2R39, in the function of some efflux transporters present in the BCSFB.

In this project we detected transcripts of 13 TAS2Rs (TAS2R3, TAS2R4, TAS2R5, TAS2R8, TAS2R10, TAS2R13, TAS2R14, TAS2R39, TAS2R40, TAS2R41, TAS2R44, TAS2R48 e TAS2R50), of an effector molecule of the taste signaling pathway (TrpM5) and 3 efflux transporters (ABCB1, ABCC1 e ABCC4) in a human epithelial CP cell line (HIBCPP), by RT-PCR. We analyzed the protein expression of 5 of these bitter receptors (TAS2R4, TAS2R5, TAS2R10, TAS2R14 e TAS2R39) by Western-Blot and immunocytochemistry. The functionality of the TAS2R14 and TAS2R39 was evaluated by calcium imaging, after the stimulation of CP cells by resveratrol described as a ligand of these TAS2R. The silencing of the receptors with specific siRNAs for TAS2R14 and TAS2R39 demonstrated a diminishing response in the cells, after stimulation with resveratrol, highlighting the role of these receptors in the response to resveratrol. We also analyzed the functionality of an efflux transporters in HIBCPP cells and their ability to acquire a barrier conformation having optimized the uptake, permeability and transepithelial electrical resistance measuring (TEER) assays. At this stage, everything is set up to perform experiments which will allow to conclude about a possible regulation of efflux transporters by the activation of TAS2R receptors.

Keywords

Choroid plexus, Resveratrol, Taste, Taste receptors, Transporters

Índice

| | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. | Introdução | 1 |
| 1.1. | O Plexo Coroide | 2 |
| 1.2. | Funções Biológicas do Plexo Coroide..... | 3 |
| 1.2.1. | Barreira Sangue-Líquido Cefalorraquidiano (BSLCR) | 4 |
| 1.3. | Barreira Hematoencefálica (BHE)..... | 5 |
| 1.4. | Transportadores nas Barreiras Cerebrais | 5 |
| 1.5. | Vigilância Química do Plexo Coroide | 9 |
| 1.5.1. | Via de Sinalização do Paladar | 10 |
| 1.5.2. | A Via do Paladar Fora da Cavidade Oral | 11 |
| 1.5.3. | Recetores do Amargo (TAS2R)..... | 14 |
| 1.6. | Resveratrol: Ligando dos Recetores Amargos..... | 15 |
| 2. | Objetivo | 17 |
| 3. | Materiais e Métodos | 19 |
| 3.1. | Cultura Celular | 20 |
| 3.1.1. | Contagem de Células..... | 20 |
| 3.2. | Extração de RNA Total | 20 |
| 3.3. | Síntese de cDNA..... | 21 |
| 3.4. | Amplificação Enzimática de DNA do Produto da Transcrição Reversa (RT-PCR) | 22 |
| 3.5. | Imunocitoquímica..... | 24 |
| 3.6. | Western Blot..... | 25 |
| 3.7. | Calcium Imaging | 26 |
| 3.8. | Ensaio MTT | 27 |
| 3.9. | Transfecção | 27 |
| 3.10. | Ensaio de Uptake | 28 |
| 3.11. | Estudos de Permeabilidade | 28 |
| 3.12. | Análise Estatística | 29 |
| 4. | Resultados..... | 30 |
| 4.1. | Expressão dos Recetores do Amargo (TAS2R), das Moléculas Efetoras da Via de Sinalização e dos Transportadores ABC na Linha Celular HIBCPP | 31 |
| 4.1.1. | Análise da Expressão Génica por RT-PCR..... | 31 |
| 4.1.2. | Análise da Expressão Proteica por Western Blot | 33 |
| 4.1.3. | Imunocitoquímica..... | 33 |
| 4.2. | Viabilidade Celular | 36 |
| 4.3. | Ensaio de “Single Cell Calcium Imaging” na Linha Celular HIBCPP: Resposta ao Resveratrol..... | 37 |
| 4.4. | Silenciamento do TAS2R14 e TAS2R39 | 37 |

| | | |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.5. | Ensaio de Uptake | 39 |
| 4.6. | Medição da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER) e Estudos de Permeabilidade .. | 40 |
| 5. | Discussão | 42 |
| 6. | Conclusão e Perspectivas Futuras | 46 |
| 7. | Referências Bibliográficas | 48 |

Lista de Figuras

Figura 1 - Sistema ventricular cerebral: secreção e movimento do líquido cefalorraquidiano

Figura 2 - Dissecção cadavérica mostrando o plexo coroide humano no ventrículo lateral esquerdo

Figura 3 - Representação do plexo coroide do ventrículo lateral.

Figura 4 - Unidade neurovascular

Figura 5 - Vias de transporte através da barreira sangue-LCR (BSLCR)

Figura 6 - Interação das substâncias de sabor amargo, doce ou *umami* com os recetores do paladar

Figura 7 - Via de biossíntese do resveratrol

Figura 8 - Sistema de filtro *transwell* padrão ou invertido

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com *GreenSafe*, dos produtos de RT-PCR, realizado com cDNA de HIBCPP

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com *GreenSafe*, dos produtos de RT-PCR, realizado com cDNA de HIBCPP

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com *GreenSafe*, dos produtos de RT-PCR, realizado com cDNA de HIBCPP

Figura 12 - *Western blot* de extratos de proteína total da linha celular HIBCPP

Figura 13 - *Western blot* de extratos de proteína total da linha celular HIBCPP

Figura 14 - Expressão de alguns recetores amargos, no CP da linha celular HIBCPP, por microscopia confocal

Figura 15 - Expressão de alguns recetores amargos, no CP da linha celular HIBCPP, por microscopia confocal

Figura 16 - Co-localização dos recetores TAS2Rs com o transportador ABCC1

Figura 17 - Viabilidade celular com incubação de resveratrol durante 24h

Figura 18 - Variação do Ca^{2+} intracelular na linha celular HIBCPP após estímulo com resveratrol

Figura 19 - Silenciamento dos recetores TAS2R14 e TAS2R39

Figura 20 - Variação do Ca^{2+} intracelular na linha celular HIBCPP após silenciamento dos recetores TAS2R14 e TAS2R39

Figura 21 - Validação do ensaio de *uptake* nas células HIBCPP

Figura 22 - Medição da TEER a partir do 3 dia de crescimento da linha celular HIBCPP

Figura 23 - Ensaio de permeabilidade do *Lucifer Yellow* (LY) das células HIBCPP

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Transportadores ABC e a sua expressão em diferentes tecidos/órgãos

Tabela 2 - Substratos dos transportadores ABC

Tabela 3 - Distribuição e função dos recetores do paladar nos diferentes tecidos/órgãos/sistema

Tabela 4 - Agonistas dos TAS2Rs

Tabela 5 - Sequência dos *primers* utilizados

Tabela 6 - Anticorpos primários e anticorpos secundários utilizados na imunocitoquímica

Tabela 7 - Percentagem de homologia dos recetores do paladar sequenciados neste trabalho, por comparação com a base de dados de *Homo sapiens* (NCBI-BLAST).

Lista de Acrónimos

| | |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| ABC | <i>ATP-Binding Cassette Transporters</i> |
| AC | Adenilato-ciclase |
| cAMP | Monofosfato de adenosina cíclico |
| ASICs | Canais iónicos de deteção de ácido |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BHE | Barreira hematoencefálica |
| BSLCR | Barreira sangue-líquido cefalorraquidiano |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| Ca ²⁺ | lão cálcio |
| CCK | Colecistoquinina |
| cDNA | DNA complementar |
| 4CL | 4-cumarate-CoA ligase |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CoA | Coenzima A |
| COX | Cicloxygenases |
| CP | Plexo coroide |
| CPEC | Células epiteliais do plexo coroide |
| DAG | Diacilglicerol |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNases I | Desoxiribonuclease I |
| dNTP'S | Desoxirribonucleotídeos trifosfato |
| EDTA | Etilenodiamina tetra acético |
| ENaC | Canais de Na ⁺ sensíveis à amilorida |
| FBS | Soro fetal bovino |
| cGMP | Monofosfato de guanosina cíclico |
| GPCRs | Recetores acoplados à proteína G |
| H ⁺ | Protão |
| HCNs | Canais de K ⁺ operados por nucleótidos cíclicos ativados por hiperpolarização |
| HIBCPP | Linha celular de papiloma do plexo coroide humano |
| IP ₃ | Inositol 1,4,5-trifosfato |
| IP ₃ R3 | Recetor inositol 1,4,5-trifosfato tipo 3 |
| K ⁺ | lão potássio |
| KRB | <i>Krebs Ringer Buffer</i> |
| LCR | Líquido cefalorraquidiano |
| Mg ²⁺ | lão magnésio |
| mRNA | RNA mensageiro |
| MRP | Proteína de resistência a múltiplas drogas |
| MTT | <i>3-(4,5-dimethylthiazol, 2-yl)-2,5-diphenyl-212 tetrazolium bromide</i> |
| Na ⁺ | lão sódio |
| NF-kB | Fator nuclear kB |
| pb | Pares de base |

| | |
|------------------|--------------------------------------------------------|
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PBS-T | <i>Phosphate Buffered Saline - Tween</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PDE | Fosfodiesterases |
| pH | Potencial de hidrogénio |
| PIP ₂ | Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato |
| PI3K | Fosfatidilinositol-3-cinase |
| PKA | Proteína Cinase A |
| PKD1L3-PKD2L1 | Heterodímero 1L3 e 2L1 da doença renal policística 1 |
| PlcB2 | Fosfolipase C B2 |
| PSA | Persulfato de amónio |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rRNA | RNA ribossomal |
| RNases | Ribonucleases |
| RT-PCR | <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i> |
| SCC | Células quimiorrecetoras solitárias |
| SDS | <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> <i>Slrna</i> |
| siRNA | <i>Small Interfering RNA</i> (RNA de interferência) |
| SIRT | Sirtuína |
| SLC | <i>Solute Carrier Transporters</i> |
| SNC | Sistema nervoso central |
| STS | Estilbeno sintase |
| T ₃ | Triiodotironina |
| T ₄ | Tiroxina |
| TC | Concentração total |
| TEER | Resistência Elétrica Transepitelial |
| TrpM5 | Canal iónico recetor de potencial transitório M5 |
| TBS | <i>Tris-Buffered Saline</i> |
| TBS-T | <i>Tris-Buffered Saline - Tween</i> |
| TTR | Transtirretina |
| UV | Ultravioleta |
| VAMPs | Proteínas de membrana associadas a vesículas |

1. Introdução

1.1. O Plexo Coroide

Os plexos coroides (CP) localizam-se no sistema ventricular do cérebro, constituído por quatro cavidades: dois ventrículos laterais o terceiro e o quarto ventrículos (Figura 1), contínuos entre si e com o canal central da medula espinal e preenchidos com líquido cefalorraquidiano (LCR). Cada um destes 4 ventrículos apresenta na sua parede um CP (Snell 2014). Nos ventrículos laterais (Figura 2), o CP corresponde a uma estrutura em forma de folha, enquanto que no terceiro e quarto ventrículos apresenta estruturas ramificadas (Damkier et al. 2010). O CP é o principal responsável pela produção e secreção do LCR (Mortazavi et al. 2014), estando também envolvido na produção de uma grande variedade de outras substâncias, que contribuem para o correto funcionamento e proteção do sistema nervoso central (SNC) (Kaur et al. 2016).

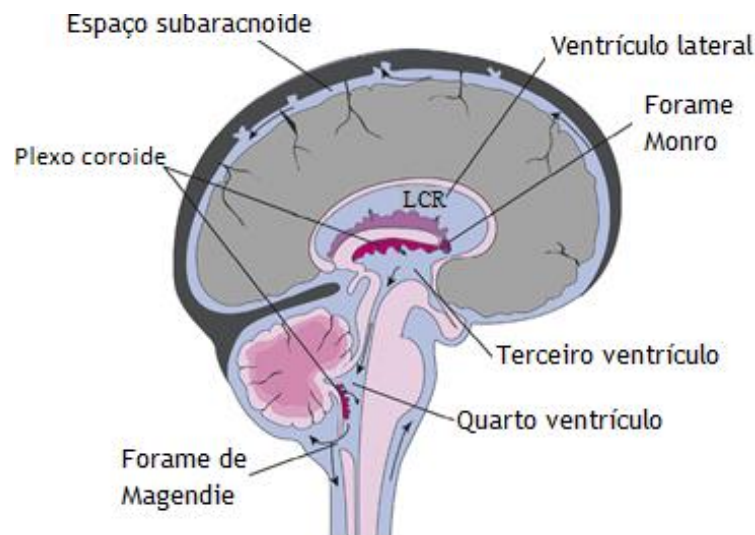


Figura 1 - Sistema ventricular cerebral: secreção e movimento do líquido cefalorraquidiano. LCR - líquido cefalorraquidiano. Adaptado de (Santos et al. 2017).

O CP é uma estrutura altamente vascularizada, formada por uma única camada contínua de células derivadas do epêndima (Figura 3), assentes em tecido conectivo rico em fibroblastos e em células do sistema imunitário (Bill & Korzh 2014; Wolburg & Paulus 2010). As células do CP, apesar de provenientes do revestimento ependimal, apresentam características de células epiteliais e, como tal, são chamadas de células epiteliais do CP (CPEC) (Lehtinen et al. 2013). As CPEC são suportadas por uma lâmina basal e constituídas por um grande núcleo esférico, rodeado por citoplasma, e apresentam na superfície apical numerosas microvilosidades e cílios, responsáveis por aumentar a superfície de contacto com o LCR (Emerich et al. 2005).

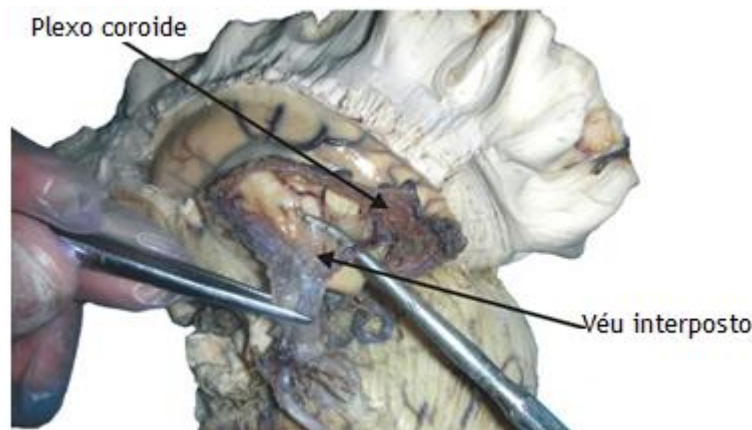


Figura 2 - Dissecação cadavérica mostrando o plexo coroide humano no ventrículo lateral esquerdo.
Adaptado de (Mortazavi et al. 2014).

1.2. Funções Biológicas do Plexo Coroide

Ao CP são atribuídas várias funções biológicas, as quais estão intrinsecamente envolvidas na manutenção do correto funcionamento do SNC. Destacam-se a produção do LCR, o fornecimento de nutrientes e hormonas ao cérebro e ao LCR, a eliminação de compostos deletérios e resíduos do metabolismo cerebral, a vigilância imunológica, a eliminação amiloide e a neurogênese. Além destas, outras funções têm sido propostas para o CP, tais como a vigilância química do LCR (Quintela et al. 2016) e do sangue ao nível da barreira sangue-LCR (BSLCR) (Santos et al. 2017), e a regulação do ritmo circadiano (Quintela et al. 2018).

O CP é o principal responsável pela produção e secreção do LCR, o qual proporciona ao cérebro fluidez e amortecimento de impactos mecânicos dentro da caixa craniana, compensa as mudanças no volume do sangue, possibilita a remoção de resíduos e auxilia na recuperação de lesões e hemorragias (Hladky & Barrand 2014).

Nos humanos, o volume de LCR varia entre 80 e 150 mL, sendo produzido continuamente a uma taxa de 500 mL por dia. Este fluido apresenta um pH ligeiramente ácido, bem como concentrações de glicose, potássio, cálcio, bicarbonato e aminoácidos inferiores às do plasma sanguíneo. Contrariamente, os níveis de sódio, cloreto e magnésio são mais elevados, sendo que os níveis de folato são duas a três vezes superiores em relação ao plasma. A transtirretina (TTR), proteína tetramérica responsável pelo transporte da hormona tiroxina, produzida e secretada pelo CP, representa 25% de todas as proteínas presentes no LCR (Emerich et al. 2005; Mortazavi et al. 2014). Para além da transtirretina, o CP também produz outras proteínas, tais como, a adrenomedulina, prostaglandina D sintase, endotelina-1, transferrina e vasopressina (Chodobski & Szmydynger-chodobska 2001; Santos et al. 2017; Schutzer et al. 2010).

O LCR, produzido pelo CP dos ventrículos laterais, flui para o terceiro ventrículo, através do forame de *Monro*, depois para o quarto ventrículo, pelo aqueduto de *Sylvius* e, em seguida, para o espaço subaracnoide, através dos forames *Luschka* e de *Magendie* (Figura 1). O LCR é permanentemente reciclado, sendo reabsorvido para a circulação sanguínea pelas vilosidades aracnoides, nos seios venosos do cérebro (Lehtinen et al. 2013; Skipor & Thiery 2008).

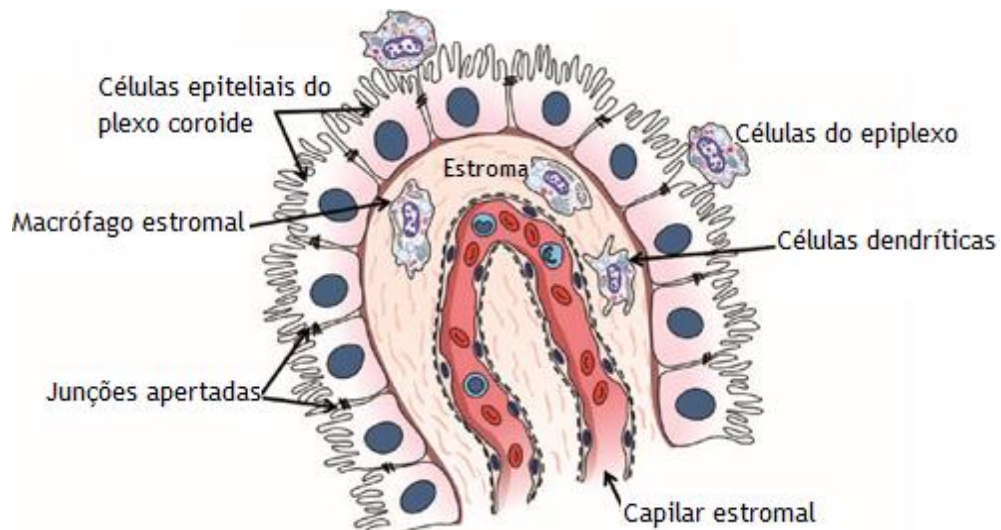


Figura 3 - Representação do plexo coroide do ventrículo lateral. A imagem representa as células epiteliais do plexo coroide, organizadas em monocamada e unidas por junções apertadas, formando uma barreira física entre o LCR e o estroma. O estroma contém células dendríticas e capilares fenestrados. Os macrófagos que se encontram associados com o plexo coroide são designados de células do epiplexo, e no caso de estarem presentes no tecido ependimal são chamados de células supraependimais. LCR - líquido cefalorraquidiano. Adaptado de (Kaur et al. 2016).

1.2.1. Barreira Sangue-Líquido Cefalorraquidiano (BSLCR)

A barreira formada pelas CPEC, a barreira sangue-CSF (BSLCR) é essencial para proteger o SNC de componentes da circulação sanguínea, como moléculas inflamatórias, agentes patogênicos ou toxinas. A presença desta barreira, além de ser extremamente importante na fase adulta, também exerce um papel fundamental durante o desenvolvimento inicial do SNC (divisão celular, migração, diferenciação e sinaptogênese) (Saunders et al. 2013). Tanto as junções apertadas existentes entre as células epiteliais, como a presença de junções aderentes que mantêm a associação física entre as células, na membrana basolateral, contribuem para a junção da barreira do CP. Para além da ligação da caderina com o epitélio, este também expressa afadina, que estabelece ligações com a nectina e ajuda na formação das junções aderentes (Kaur et al. 2016). As junções apertadas regulam a difusão de água, íons e outras moléculas mais pequenas, além de assegurarem a polaridade celular, e assim impedir que ocorra o movimento dos componentes da membrana apical para a membrana basolateral. As junções apertadas são constituídas por ocludinas, claudinas (1, 2, 3 e 11) e moléculas de adesão juncional A e C (Tietz & Engelhardt 2015).

1.3. Barreira Hematoencefálica (BHE)

O correto funcionamento do cérebro é assegurado também pela presença da barreira hematoencefálica (BHE), uma estrutura altamente especializada e composta por diferentes tipos de células, que controlam o movimento de moléculas entre o sangue periférico e o encéfalo (Tajes et al. 2014). A BHE é formada por células endoteliais especializadas, astrócitos, pericitos, neurónios, microglia e células imunitárias periféricas, a comunicação destes tipos celulares origina a unidade neurovascular (Figura 4) (Blanchette & Daneman 2015; Tajes et al. 2014; Keaney & Campbell 2015). Os astrócitos fixam as suas extremidades na lâmina basal das células endoteliais, tais interações são importantes para sincronizar os níveis de metabolitos com o fluxo sanguíneo cerebral e regular o conteúdo de água no cérebro (Serlin et al. 2015). Os pericitos desempenham um papel importante na regulação do diâmetro capilar, fluxo sanguíneo cerebral e secreção da proteína da matriz extracelular (Keaney & Campbell 2015). A unidade neurovascular mais interna é constituída por junções apertadas e junções aderentes, as primeiras são responsáveis pela associação das células endoteliais, enquanto que, as junções aderentes desempenham um papel importante na iniciação e manutenção das junções apertadas. As junções apertadas são constituídas por proteínas transmembranares (molécula de adesão juncional, ocludina e claudinas) e proteínas acessórias citoplasmáticas (zónula ocludente e cingulina) e as junções aderentes são formadas por caderinas e cateninas (Blanchette & Daneman 2015; Tajes et al. 2014).

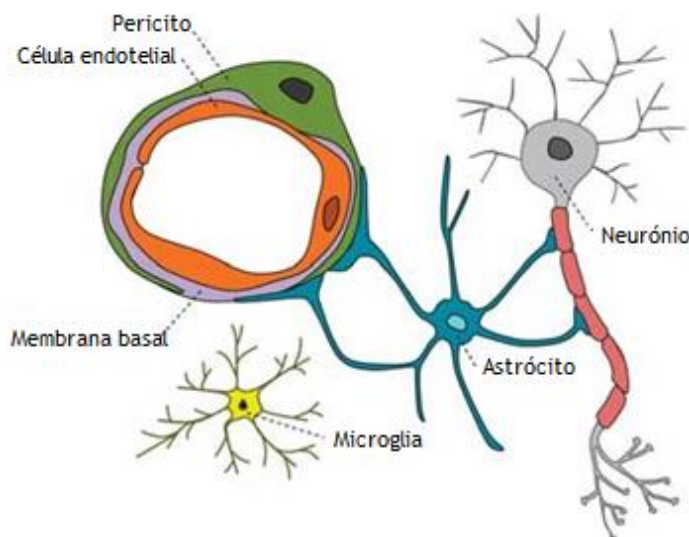


Figura 4 - Unidade neurovascular. Interação entre as células vasculares (pericitos e células endoteliais), glia (astrócitos e microglia) e neurónios. Adaptado de (Sweeney et al. 2015).

1.4. Transportadores nas Barreiras Cerebrais

As interfases BSLCR e BHE protegem o SNC de agressões como agentes patogénicos e toxinas, funcionando como portas de entrada de nutrientes e portas de saída de metabolitos. As funções protetoras destas barreiras são responsáveis pela baixa disponibilidade de numerosos

agentes farmacológicos para o tratamento de doenças do SNC. Um dos principais desafios da farmacologia diz respeito à procura de meios para controlar a permeabilidade destas duas barreiras. As células que formam estas interfaces contêm transportadores e enzimas, responsáveis por controlar a entrada e saída de moléculas, sendo este processo exercido por mecanismos de influxo e efluxo altamente específicos. Dentro dos transportadores, podem-se distinguir dois tipos: os ativos, que possibilitam o movimento de solutos contra o gradiente de concentração, sendo para isso necessário gasto de energia (ATP), e os passivos, que permitem o movimento a favor do gradiente de concentração, sem gastos de energia (Figura 5) (Saunders et al. 2013).

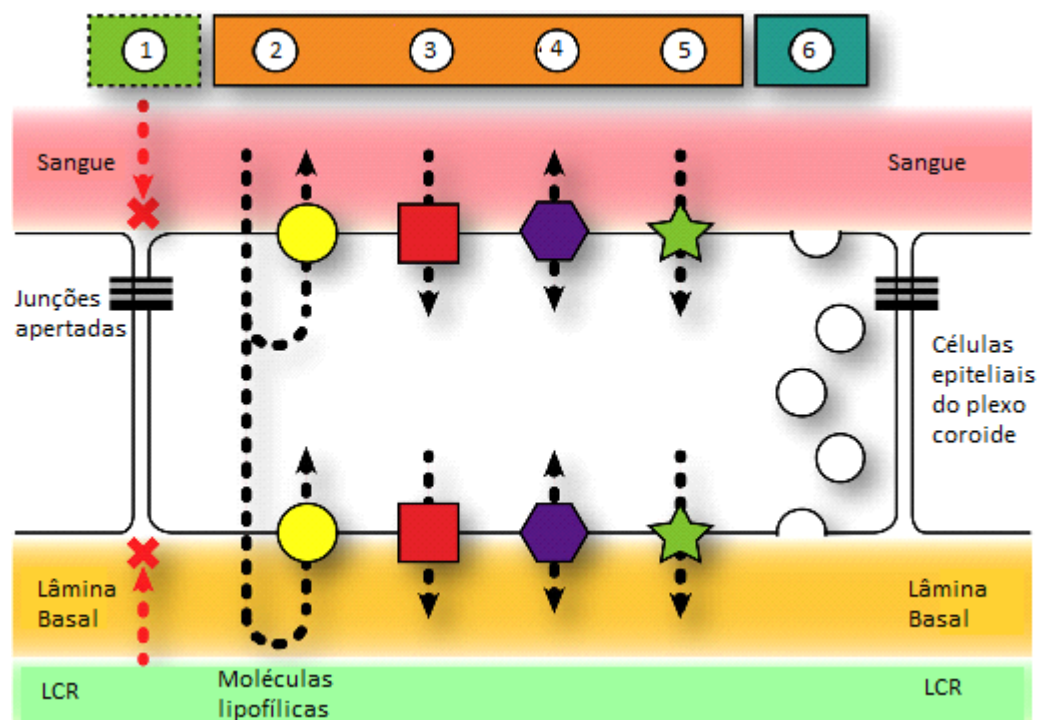


Figura 5 - Vias de transporte através da barreira sangue-LCR (BSLCR). 1 - Via paracelular (difusão para moléculas hidrofílicas) é interrompida pela presença de junções apertadas. 2 - Transportadores de efluxo (família ABC) removem ativamente solutos específicos da célula e do espaço extracelular. A maioria das moléculas de substrato é lipofílica. 3 - Transportadores de influxo (família SLC) transportam ativamente íons, aminoácidos e outras moléculas pequenas através da membrana basolateral e apical das células. 4 - Transportadores bidirecionais. 5 - Os transportadores de proteínas visam especificamente proteínas individuais e transportam-nas através das células da barreira. 6 - O transporte vesicular/endocitose ocorre devido à presença de recetores específicos (recetor da TTR) ou mediadores não específicos (proteínas de membrana associadas a vesículas, VAMPs). ABC - *ATP-binding cassette transporters*; LCR - líquido cefalorraquidiano; SLC - *solute carrier transporters*; TTR - transtirretina. Adaptado de (Saunders et al. 2013).

Dentro dos transportadores de efluxo, encontram-se os *ATP-Binding Cassette Transporters* (ABC), alguns dos quais localizados tanto na barreira hematoencefálica como na BSLCR. Esta superfamília consiste em 49 genes com funções diferentes e divididos em 7 grupos, classificados de A a G (Shair et al. 2018). Alguns destes transportadores, como o ABCB4, apresentam níveis de expressão semelhantes nas duas barreiras. Os transportadores ABCB1 e

ABCG2 são altamente expressos na BHE embora também possam estar presentes na BSLCR, com níveis de expressão mais baixos, sendo que o ABCC1 é o principal transportador presente na BSLCR (Strazielle & Ghersi-Egea 2015). O ABCB1, também conhecido como glicoproteína-P, foi o primeiro membro desta família a ser identificado (Loo et al. 2013). Este transportador localiza-se na membrana apical do CP e é altamente expresso na membrana da mucosa intestinal, no epitélio do túbulo proximal do rim, fígado, placenta e BHE (Tabela 1). A sua principal função é proteger contra xenobióticos e tóxicos celulares. O ABCB1 possui uma ampla gama de substratos, sendo essas moléculas orgânicas que variam em tamanho de 200 Da até 1900 Da (Tabela 2) (Bugde et al. 2017).

O transportador ABCC1 (MRP1), também conhecido como proteína de resistência a múltiplas drogas, está localizado na BHE, BSLCR, intestino, fígado fetal e rins (Tabela 1) (Sodani et al. 2012). Tal como o ABCB1, este transportador possui uma ampla variedade de substratos, onde se incluem o metotrexato e a sulforodamina (Tabela 2). Foram identificados diversos inibidores para o ABCC1, mas são necessários mais estudos para determinar a sua especificidade, embora os inibidores do transporte de aniões orgânicos tenham demonstrado resultados positivos (Bugde et al. 2017).

O ABCC4 (MRP4), tal como os restantes membros da subfamília ABCCs é um transportador de aniões orgânicos conjugados, como a glutatona e glucuronídeo. A sua expressão é encontrada na BHE, BSLCR, pulmões, rins, bexiga, vesícula e amígdala (Tabela 1). A importância deste transportador no processamento de agentes farmacológicos é evidenciada pela sua dupla localização na membrana basolateral e apical do plexo coroado. O ABCC4 medeia o efluxo celular de cAMP e cGMP que transmitem sinais externos para proteínas cinases. Para além disto, os eicosanóides, incluindo as prostaglandinas, são também substratos deste transportador (Tabela 2) (Shair et al. 2018; Bugde et al. 2017).

O ABCG2 é o segundo membro da subfamília das proteínas transportadoras. O seu mRNA codifica para uma proteína de 72 kDa de 655 aminoácidos que forma um domínio de ligação de nucleótido único e seis domínios transmembranares. A função endógena deste transportador é variada e a sua expressão pode ser encontrada na BHE, BSLCR, células estaminais, na membrana apical dos enterócitos, nos canalículos do fígado e nos túbulos proximais dos rins (Tabela 1). A inibição do ABCG2 é de grande interesse em termos terapêuticos. A primeira série de inibidores incluiu a ciclosporina A, o pantoprazol e o verapamil, mas demonstrou eficácia clínica limitada devido a toxicidade significativa. Os inibidores de segunda geração incluíram o topotecano, o irinotecano e o gefitinib. Contudo, as preocupações relacionadas com a sua citotoxicidade não foram ultrapassadas. Os inibidores de terceira geração incluem a fumitremorgina C e Ko143, mas novamente o uso clínico é limitado. Deste modo, existe uma necessidade de identificar novos inibidores com perfil de segurança tolerável. Uma alternativa a estes inibidores poderá passar pelo uso dos flavonóides, compostos polifenólicos que possuem uma série de efeitos benéficos para o

organismo. A interação dos flavonoides com vários transportadores tem sido descrita na literatura, indicando a capacidade de inibirem o transporte mediado pelos transportadores ABC. Estudos utilizando a linha celular de CP de rato (Z310) demonstraram a capacidade inibitória dos flavonoides, naringina e silimarina, observando-se uma inibição na atividade do transportador ABCG2 e, conseqüentemente, um aumento na acumulação intracelular do substrato (*Hoechst 33342*). Para além disto, estes flavonoides obtiveram níveis de citotoxicidade inferiores relativamente aos inibidores tradicionais (Ko143) (Kaur & Badhan 2015).

Tabela 1 - Transportadores ABC e a sua expressão em diferentes tecidos/órgãos. (Zhang et al. 2015).

| Transportador ABC | Nome da proteína | Localização na membrana | Distribuição |
|-------------------|------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ABCB1 | Glicoproteína-P | Apical | BHE, BSLCR placenta, fígado, rim, pâncreas, colon, intestino delgado e parênquima cerebral (astrócitos e microglia) |
| ABCC1 | MRP-1 | Basolateral | BHE, BSLCR, colon, coração, placenta, pâncreas, próstata, ovários, rins, pulmões, músculo esquelético, pele, intestino delgado, baço e testículos |
| ABCC2 | MRP-2 | Apical | BHE, BSLCR, fígado, pulmões, pâncreas, placenta e intestino delgado |
| ABCC3 | MRP-3 | Basolateral | Colon, adrenais, fígado, rins, pâncreas, placenta, próstata, intestino delgado e baço |
| ABCC4 | MRP-4 | Apical, basolateral | BHE, BSLCR, adrenais, colon, coração, fígado, rins, pulmões, ovários, placenta, pâncreas, próstata, músculo esquelético, pele, intestino delgado, músculo liso, baço e testículos |
| ABCC5 | MRP-5 | Apical, basolateral | BHE, BSLCR, coração, placenta, músculo esquelético e músculo liso |
| ABCG2 | BCRP | Apical | BHE, BSLCR, placenta, vesícula seminal, fígado, rins e intestino delgado |

Além dos transportadores ABC, existe também a superfamília dos transportadores *Solute Carrier Transporters* (SLC), que são responsáveis pela proteção do cérebro e do LCR contra moléculas tóxicas, endógenas e exógenas. Por exemplo, a subfamília SLC22 inclui transportadores de efluxo, catiónicos e aniónicos, que são conhecidos como proteínas *Organic Anion Transporter*, *Organic Cation Transporter* e *Organic Cation Transporter Novel*. Os transportadores SLCO (ou SLC21), constituem outra subfamília de polipéptidos de transporte de aniões orgânicos. Estas duas subfamílias respondem a diversos compostos catiónicos e aniónicos, incluindo poluentes ambientais, medicamentos, como antibióticos e medicamentos antivirais, agentes anti-inflamatórios não esteroides e alguns medicamentos antiepiléticos

(Strazielle & Gherzi-Egea 2015). Os membros da família SLC15 são uma terceira subfamília destes transportadores, conhecidos como transportadores de péptidos/protões, e são responsáveis pelo transporte de dipéptidos e tripéptidos endógenos e alguns fármacos peptidomiméticos, como por exemplo, antibióticos B-lactâmicos, pró-fármacos antivirais ou enzimas de conversão de angiotensina (Daniel & Rubio-aliaga 2003). Estes transportadores podem estar localizados na BHE (SLC22 e SLCO) e na BSLCR (SLC22, SLCO e SLC15) (Strazielle & Gherzi-Egea 2015).

Tabela 2 - Substratos dos transportadores ABC (Bugde et al. 2017).

| Transportador ABC | Substratos |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ABCB1 | 5-fluorouracilo, actinomicina D, bisantreno, clorambucil, colchicina, cisplatina, citarabina, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, etoposido, gefitinib, hidroxiureia, irinotecano, metotrexato, mitomicina C, mitoxantrona, paclitaxel, tamoxifeno, topotecano, vimblastina e vincristina |
| ABCC1 | Daunorrubicina, doxorubicina, imatinib etoposido, teniposido, camptotecina vimblastina, vincristina e metotrexato |
| ABCC2 | Cisplatina, doxorubicina, epirubicina, etoposido, irinotecano, mitoxantrona, metotrexato, vimblastina, vincristina e oxaliplatina |
| ABCC3 | Metotrexato, etoposido e teniposido |
| ABCC4 | Tiopurinas, metotrexato, tioguanina e topotecano |
| ABCC5 | 6-Mercaptopurina, metotrexato, zidovudina e gemcitabina |
| ABCG2 | Daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, etoposido, irinotecano, mitoxantrona, topotecano e bisantreno |

1.5. Vigilância Química do Plexo Coroide

Apesar de serem já conhecidas muitas funções do CP, diferentes trabalhos de investigação realizados nos últimos anos têm vindo a demonstrar interesse por outras funções deste tecido. Em 2013, num estudo de *microarrays* de cDNA realizado com CP de ratos machos e fêmeas, foram detetadas diferenças na expressão de genes das vias de sinalização do paladar e do olfato (Quintela et al. 2013). Desde esta descoberta, a presença e funcionalidade da via de transdução do paladar foi confirmada no CP (Tomás et al. 2016). A deteção de mRNA e de proteína dos recetores do paladar, assim como de várias moléculas da via de sinalização, foi observada em CPEC e em explantes de CP. Além disto, em culturas de CPEC estimuladas com ligandos de alguns recetores do paladar, observou-se um aumento dos níveis intracelulares de cálcio, confirmando a funcionalidade da via (Tomás et al. 2016). Contudo, a relevância funcional da presença destes recetores no CP é ainda desconhecida e objeto de estudo do nosso grupo de investigação.

1.5.1. Via de Sinalização do Paladar

A capacidade de perceber, reconhecer e responder a estímulos é essencial para a sobrevivência dos organismos. O paladar é um dos sentidos básicos que, na cavidade oral tem duas funções principais: o reconhecimento de nutrientes essenciais e a proteção contra compostos que são tóxicos ou nocivos (Cygankiewicz et al. 2014). O homem pode detetar e discriminar cinco tipos de estímulos gustativos diferentes: doce, amargo, *umami*, ácido e salgado. A detecção de compostos ácidos e salgados é mediada e controlada por canais iónicos, enquanto que os sabores doce, *umami* e amargo são detetados pelos recetores acoplados à proteína G (GPCRs). A percepção do sabor salgado (Na^+) é predominantemente traduzida por canais de Na^+ sensíveis à amilorida (ENaCs) (Shigemura & Ninomiya 2016). Existem alguns recetores prováveis para a detecção do sabor ácido, tais como: canais de Na^+ sensíveis à amilorida (ENaCs), canais iónicos de detecção de ácido (ASICs), canais de K^+ operados por nucleótidos cíclicos ativados por hiperpolarização (HCNs) e o heterodímero 1L3-2L1 da doença renal policística 1 (PKD1L3-PKD2L1) (Yamamoto & Ishimaru 2013). As moléculas de sabor doce e *umami* são detetadas por heterodímeros de TAS1Rs, sendo que para o sabor doce, o heterodímero é formado por TAS1R2 e TAS1R3 (Roper & Chaudhari 2017; D. Kikut-Ligaj and J. Trzcielinska-Lorych 2016) enquanto que, no sabor *umami*, a subunidade TAS1R2 é substituída por TAS1R1 (Cygankiewicz et al. 2014).

Os compostos tóxicos têm normalmente sabor amargo, pelo que a sua percepção funciona como um sinal de aviso de forma a evitar a sua ingestão. Estes tipos de compostos são detetados por outro tipo de GPCRs, os TAS2Rs. Nos humanos, foram identificados 25 membros desta família e 34 nos ratos (Ishimaru 2009; Adler et al. 2000). Os recetores TAS2R são ativados por diversos tipos de compostos amargos, tais como, amidas (denatônio) e alcaloides (estricnina, cafeína e quinina). Alguns aminoácidos, ureia, ácidos gordos, fenóis, aminas e sais de potássio, magnésio e cálcio também conferem o sabor amargo (Cygankiewicz et al. 2014).

A ligação das diferentes substâncias aos recetores TAS1R e TAS2R, localizados na membrana apical da célula gustativa, provoca a dissociação de uma proteína heterotrimérica, denominada de gustaducina, que posteriormente leva à ativação da fosfolipase C $\beta 2$ (PLC $\beta 2$), que por sua vez hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$) em diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$). O IP $_3$ liga-se ao seu recetor, presente na membrana dos reservatórios, e desencadeia um aumento na libertação de cálcio (Ca^{2+}) intracelular. Este aumento das concentrações de Ca^{2+} estimulam o canal iónico recetor de potencial transitório M5 (TrpM5), presente na membrana basolateral e, conseqüentemente, leva ao influxo de sódio (Na^+) e à despolarização da membrana, ocorrendo a libertação de neurotransmissores em resposta ao aumento do potencial (Figura 6) (Ishimaru 2009; Cygankiewicz et al. 2014).

A dissociação da gustaducina origina duas subunidades (α e β) (Chandrashekar et al. 2006). A subunidade β desencadeia a via de sinalização descrita anteriormente, enquanto a

subunidade α controla uma segunda via de sinalização, onde está envolvido o AMP cíclico (cAMP), que tanto pode levar ao aumento do cAMP pela ativação da adenilato ciclase (AC), como à diminuição pela ativação de fosfodiesterases (PDE). Assim, a ligação dos ligandos aos recetores através da proteína G ativa a AC, que converte o ATP em cAMP, que seguidamente ativa a proteína cinase A (PKA), fechando os canais de potássio (K^+) através de fosforilação. Isto provoca a despolarização da membrana e, conseqüentemente o influxo de iões de Ca^{2+} através dos canais de cálcio dependentes de voltagem. A etapa final de todo este mecanismo consiste na libertação de neurotransmissores (Cygankiewicz et al. 2014).

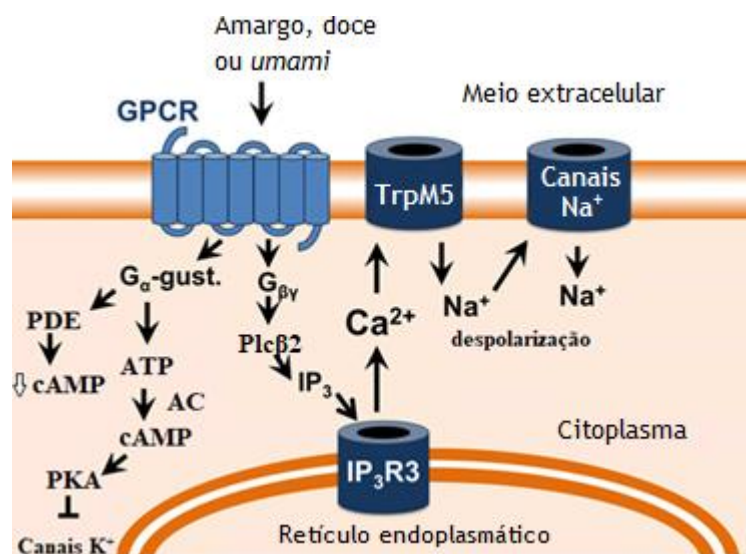


Figura 6 - Interação das substâncias de sabor amargo, doce ou *umami* com os recetores do paladar. AC - adenilato ciclase; cAMP - monofosfato de adenosina cíclico; ATP - adenosina trifosfato; Ca^{2+} - ião cálcio; IP_3 - inositol-1,4,5-trifosfato; IP_3R3 - recetor inositol-1,4,5-trifosfato tipo 3; GPCR - recetores acoplados à proteína G; K^+ - ião potássio; Na^+ - ião sódio; PDE - fosfodiesterases; PKA - proteína cinase A; Plcβ2 - fosfolipase C β2; TrpM5 - Canal iónico recetor de potencial transitório M5. Adaptado de (Lee & Cohen 2016).

1.5.2.A Via do Paladar Fora da Cavidade Oral

Os genes que codificam para os recetores do paladar (TAS1Rs e TAS2Rs) e para as moléculas efetoras da via de sinalização (proteínas G, TrpM5 e Plcβ2), além de serem expressos nas papilas gustativas também se encontram em diversos tecidos, incluindo o trato respiratório, estômago, intestino, pâncreas, pulmão, coração, tireoide, fígado, rins, testículos, espermatozoides, pele e cérebro (Tabela 3) (Gilca & Dragos 2017).

Estudos com roedores mostraram que as moléculas relacionadas com a via do paladar são expressas em diferentes tipos de células, incluindo as células quimiorrecetoras solitárias (SCCs), células epiteliais ciliadas e células musculares lisas, que fazem parte do trato respiratório. Ao contrário das células presentes nas papilas gustativas, as SCCs expressam TAS1R3 e TAS2Rs (Saunders et al. 2016). As SCCs de ratos revelaram libertar acetilcolina após estimulação com compostos químicos “amargos” ou sinais bacterianos, levando à ativação dos

recetores nicotínicos nas fibras nervosas sensoriais, diminuindo a frequência respiratória ou induzindo inflamação neurogénica na cavidade nasal (Lu et al. 2017).

A detecção de compostos amargos, por parte dos recetores TAS2R, está também associada à homeostasia das vias respiratórias. O reconhecimento destes compostos possibilita a libertação de óxido nítrico bactericida e estimula o batimento ciliar, garantindo a eliminação de bactérias e compostos nocivos das vias aéreas. Determinados alelos de polimorfismos identificados para o TAS2R38, um dos recetores do amargo, estão ligados à rinossinusite respiratória e crónica, demonstrando a importância destes recetores nas vias aéreas (Lee et al. 2012; Lee et al. 2014; Ahmed et al. 2016).

Os recetores TAS2Rs têm também um papel ativo na mucosa gástrica e intestinal, pois detetam nutrientes e outros compostos (glicose, aminoácidos, péptidos, gorduras e tóxicos), ativando vários mecanismos de defesa, e estimulam a secreção de hormonas reguladoras do apetite (Rozengurt & Sternini 2007). Os TAS2Rs também foram encontrados em células enteroendócrinas do intestino delgado. O aumento de Ca^{2+} , resultado da ativação destes recetores, leva à libertação de colecistoquinina (CCK), que atua quer através dos recetores CCK2 nos enterócitos vizinhos, estimulando o transportador ABCB1 para bombear toxinas (compostos amargos) para fora das células, ou através dos recetores CCK1 nas fibras nervosas do nervo vago, transmitindo sinais para o cérebro para controlar a ingestão de alimentos (Lu et al. 2017).

A ingestão de alimentos faz aumentar os níveis de glicose e, consequentemente, ocorre a produção de insulina através das células pancreáticas. Estudos demonstraram que o mecanismo responsável por esta produção pode ser regulado pelos recetores do paladar. Sabe-se que a glicose entra nas células através dos canais GLUT2, sendo depois metabolizada, provocando um aumento do ATP que leva ao encerramento dos canais K^+ e, consequentemente, à despolarização da membrana. Posteriormente, ocorre a abertura dos canais Ca^{2+} , ocorrendo entrada de cálcio e estimulação da secreção de insulina. Como complementação a este mecanismo, o TrpM5 parece desempenhar um papel importante na produção de insulina, nomeadamente na estimulação dos canais de Ca^{2+} e, consequentemente, despolarização da membrana (Yamamoto & Ishimaru 2013).

Estudos com murganhos demonstraram também a expressão destes recetores nos testículos e nos espermatozoides. Apesar de ainda não haver resultados conclusivos sobre a sua influência na espermatogénese, quando estes recetores são silenciados ou têm uma expressão reduzida, há um impacto na produção dos espermatozoides e, consequentemente, na fertilidade (Gentiluomo et al. 2018).

Tabela 3 - Distribuição e função dos recetores do paladar nos diferentes tecidos/órgãos/sistema. m - murganho; r - rato.

| Tecido/órgão/sistema | | Recetores | Espécie | Função | Referência |
|--------------------------|---------|-------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Coração | | Tas1R1, Tas1R3 e Tas2Rs | Homem, rato e murganho | - | (Foster et al. 2013) |
| Estômago (antro e fundo) | | rTas2R (16, 34 e 38) mTas2R (108, 134 e 138) | Rato e murganho | - | (Wu et al. 2005) |
| Fígado | | TAS1R3 | Homem | Monitorização da bÍlis | (Taniguchi 2004) |
| Intestino (duodeno) | Delgado | rTas2R (16, 34 e 38) mTas2R (108, 134 e 138) | Rato e murganho | Regulação da secreção de péptidos intestinais | (Wu et al. 2005) |
| Intestino Grosso | | TAS2R (1, 4 e 38) rTas2R (1, 16 e 26) | Homem e rato | Secreção de aniões | (Kaji et al. 2009) |
| Leucócitos | | TAS2R (4, 5 10, 13, 14, 19, 20, 31, 45, 46 e 50) | Homem | Papel anti-inflamatório na asma | (Orsmark-Pietras et al. 2013) |
| Pâncreas | | TAS1R3 | Homem | Secreção de hormonas (insulina e glucagon) | (Taniguchi 2004) |
| Plexo coroide | | rTas1R (1, 2 e 3) rTas2R (109 e 144) | Rato | Vigilância química | (Tomás et al. 2016) |
| Queratinócitos | | TAS2R1 e TAS2R38 | Homem | Diferenciação dos queratinócitos | (Wölfle et al. 2015) |
| Rins | | mTas2R105 | Murganho | Manutenção estrutural dos glomérulos e túbulo renal | (Liu et al. 2015) |
| Testículos | | mTas2R (105, 106, 107, 108, 113, 117, 119, 125 e 126) | Murganho | Espermatogênese | (Xu et al. 2013) |
| Tiroide | | TAS2R (4, 10, 38, 42, 43) | Homem | Regulação da secreção de T ₃ e T ₄ | (Clark et al. 2015) |
| Traqueia | | mTas2R (105 e 108) | Murganho | Regulação da respiração | (Krasteva et al. 2011) |
| Vias aéreas | | TAS2R38 | Homem | Efeitos antibacterianos Eliminação de agentes patogénicos através dos cílios | (Lee et al. 2012; Shah et al. 2009) |

1.5.3. Recetores do Amargo (TAS2R)

Como mencionado anteriormente, a via do paladar foi recentemente descrita no CP de rato, incluindo a expressão de dois TAS2R (109 e 144) (Tomás et al. 2016). Nos humanos são conhecidos 25 TAS2R (Ishimaru 2009; Adler et al. 2000; Matsunami et al. 2000). Apesar da expressão dos TAS2R ainda não ter sido descrita no CP humano, um estudo de *microarrays* efetuado por outro grupo de investigação, revelou a existência de transcritos dos 25 TAS2R (número de acesso na base de dados *Gene Expression Omnibus*: GSE49974) em CP humano (Janssen et al. 2013).

Sendo os recetores TAS2R responsáveis por reconhecer estímulos amargos, podemos salientar diversos compostos com potencial terapêutico (Tabela 4), ligandos destes recetores, tais como o resveratrol, descrito como ligando dos TAS2R14 e TAS2R39 (Roland et al. 2013)

Tabela 4 - Agonistas dos TAS2Rs. EC₅₀ - concentração que induz 50% da resposta; TC - concentração total.

| Tas2R | Agonistas | Concentração (μM) | Referência |
|---------|--------------------------|------------------------------|------------------------|
| TAS2R4 | Benzoato de denatônio | 300 (TC) | (Meyerhof et al. 2010) |
| | Epicatequina | 30151 (EC ₅₀) | (Soares et al. 2013) |
| | Partenolide | 30 (TC) | (Meyerhof et al. 2010) |
| | Quinina | 1000±380 (EC ₅₀) | (Pydi et al. 2012) |
| TAS2R5 | Epicatequina | 3210±42 (EC ₅₀) | (Soares et al. 2013) |
| TAS2R10 | Benzoato de denatônio | 3 (TC) | (Meyerhof et al. 2010) |
| | Cafeína | 300 (TC) | |
| | Cloranfenicol | 100 (TC) | |
| | Haloperidol | 30 (TC) | |
| | Partenolide | 30 (TC) | |
| | Quinina | 10 (TC) | |
| TAS2R14 | Benzamida | 300 (TC) | (Meyerhof et al. 2010) |
| | Cafeína | 300 (TC) | |
| | Epicatequina | 70 (EC ₅₀) | (Yamazaki et al. 2013) |
| | Epigallocatequina galato | 34 (EC ₅₀) | |
| | Flavona | 20.5 (EC ₅₀) | (Roland et al. 2013) |
| | Genisteína | 28.9 (EC ₅₀) | |
| | Haloperidol | 30 (TC) | (Meyerhof et al. 2010) |
| | Naringina | 36.2 (EC ₅₀) | (Roland et al. 2013) |
| | Quercetina | 1 (TC) | (Levit et al. 2014) |
| | Quinina | 10 (TC) | (Meyerhof et al. 2010) |
| | Resveratrol | 30.3 (EC ₅₀) | (Roland et al. 2013) |
| TAS2R39 | Alanina | 580±10 (EC ₅₀) | (Meyerhof et al. 2010) |
| | Benzoato de denatônio | 100 (TC) | |
| | Cloranfenicol | 1000 (TC) | |
| | Flavona | 45.9 (EC ₅₀) | (Roland et al. 2013) |
| | Genisteína | 49.4 (EC ₅₀) | |
| | Histidina | 430 (TC) | (Ji et al. 2014) |
| | Naringina | 32.9 (EC ₅₀) | (Roland et al. 2013) |
| | Quinina | 10 (TC) | (Meyerhof et al. 2010) |
| | Resveratrol | 109 (EC ₅₀) | (Roland et al. 2013) |

1.6. Resveratrol: Ligando dos Recetores Amargos

Existem diversos compostos amargos que ligam aos recetores TAS2R, sendo um deles o resveratrol. Este composto tem a capacidade de se ligar aos recetores TAS2R14 e TAS2R39, presentes no plexo coróide (Roland et al. 2013).

O resveratrol (*3,5,4-trihydroxy-trans-stilbene*) é um polifenol natural encontrado nas uvas, morangos, amendoins e chá (Bourassa & Bariyanga 2013), com propriedades antifúngicas. É produzido, por uma grande variedade de espécies de plantas, em resposta a patógenos ou a situações de stress, como radiação UV e exposição a iões de metais pesados. Existem duas isoformas de resveratrol, *trans* e *cis*, sendo que a primeira é a isoforma mais estável. Nas plantas, a biossíntese do resveratrol (Figura 7) inicia-se com o acoplamento do ácido p-cumárico, um intermediário na produção de lignina, à coenzima A (CoA) por ação da 4-cumarate-CoA ligase (4CL). Posteriormente, o cumaruil-CoA é convertido em resveratrol, pela ligação de 3 moléculas de malonil-CoA, sendo que esta reação é catalisada pela estilbeno sintase (STS), ocorrendo a libertação de dióxido de carbono (Tellone et al. 2015).

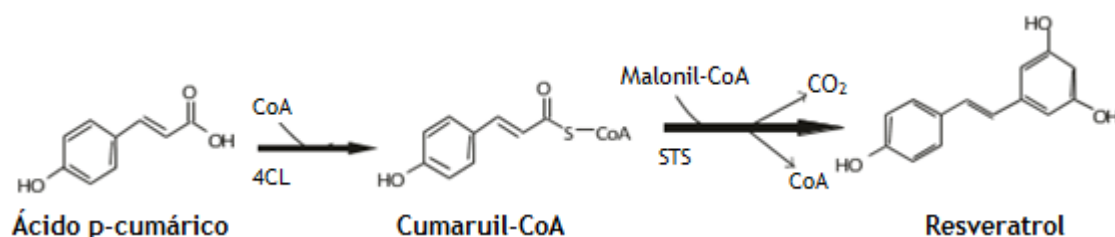


Figura 7 - Via de biossíntese do resveratrol. 4CL - 4-Cumarate-CoA ligase; CO₂ - Dióxido de carbono; CoA - Coenzima A; STS - Estilbeno Sintase. Adaptado de Tellone et al. 2015.

Diversos estudos têm sido realizados com o resveratrol onde tem sido demonstrado o seu potencial terapêutico. O resveratrol apresenta a capacidade de prevenir/retardar a progressão de doenças como o cancro, doenças cardiovasculares e lesões isquémicas (Choi et al. 2014). A intensidade dos efeitos biológicos proporcionados pelo resveratrol está relacionada com a conformação estrutural do composto, sendo a disposição do grupo fenol o fator essencial para o desenvolvimento da sua atividade antioxidante, ou seja, a capacidade de se ligar aos radicais livres, e consequentemente prevenir o desenvolvimento de stress oxidativo (Leonard et al. 2003). Entre os efeitos proporcionados pela atividade antioxidante do resveratrol, a proteção cardiovascular foi amplamente estudada, por resultar de uma variedade de efeitos antioxidantes exercidos pelo composto, tais como a prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (Leonard et al. 2003), vasodilatação, proteção do endotélio vascular e redução da obesidade (Naderali 2009). O resveratrol também demonstrou resultados positivos no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, doença de Huntington, isquemia cerebral, esclerose lateral amiotrófica e epilepsia (Tellone et al. 2015).

Este composto tem a capacidade de ativar a enzima SIRT1, uma das formas da família das sirtuínas, que provoca a desacetilação de histonas e não-histonas, incluindo fatores de transcrição. É responsável pela regulação do metabolismo, resistência ao stress, sobrevivência celular, senescência celular, funções endoteliais e ritmo circadiano (Chung et al. 2011). O interesse terapêutico do resveratrol ao nível do cancro tem sido demonstrado em diferentes estudos. Este composto tem a capacidade de atuar nas diversas vias de sinalização do cancro, afetando os três estados da carcinogénese: iniciação, promoção e progressão (Berman et al. 2017). Adicionalmente, o resveratrol induz diretamente a via apoptótica através de vários mecanismos: interfere na via de sinalização do fator nuclear κB (NF- κB), que regula a inflamação, a resposta imune à infeção e a resposta celular aos estímulos; e inibe o IGF-1R/Akt/Wnt e ativa a p53, influenciando o desenvolvimento celular e a tumorigénese (Sarkar et al. 2010). Outra das vias que é inibida pelo resveratrol é a via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), que regula a diferenciação celular, crescimento, proliferação e outras atividades (Berman et al. 2017).

O resveratrol inibe as cicloxigenases (COX), que são responsáveis pela conversão do ácido araquidónico em prostaglandinas. A supressão desta via reduz a inflamação, o que sugere a possibilidade de o resveratrol atuar no tratamento de condições inflamatórias (Kundu et al. 2006). Outra das inibições provocadas por este composto, é a expressão de moléculas de adesão vascular, afetando a atividade das células musculares lisas vasculares, responsáveis pelo desenvolvimento de aterosclerose e hipertensão. Para além disto, o resveratrol inibe a agregação plaquetária, o que pode ser eficaz na prevenção da formação de coágulos sanguíneos e, consequentemente, prevenir o enfarte do miocárdio e acidente vascular cerebral (Carluccio et al. 2003).

2. Objetivo

O nosso grupo de investigação identificou recentemente a presença de recetores do paladar nas barreiras cerebrais: barreira hematoencefálica (Comunicação pessoal) e no plexo coroide (CP; barreira sangue-líquido cefalorraquidiano) (Tomas et al. 2016), sendo a sua função ainda desconhecida.

Contudo, dada a relevância destas barreiras na regulação do tráfico molecular para dentro e para fora do SNC, de acordo com a natureza e função atribuídas aos recetores do paladar noutros tecidos, é possível que os mesmos estejam envolvidos na deteção de compostos químicos no SNC e na periferia, de modo a ativar transportadores de efluxo (ABC) ou mecanismos de destoxificação para os eliminar.

Um problema central nas doenças neurológicas, nos cancros cerebrais e nas metástases de outros cancros no cérebro é a dificuldade em tornar as drogas disponíveis, nos alvos cerebrais, em concentrações satisfatórias para que possam ser eficientes. Para isso, estas drogas têm que superar os transportadores de efluxo, presentes nas barreiras cerebrais. A forma como os transportadores são regulados está ainda pouco esclarecida. Assim, encontrar mecanismos responsáveis por este controlo poderá representar um enorme desafio para as neurociências e para a terapia das doenças que afetam o SNC. Deste modo, o presente estudo tem como objetivo analisar a função dos recetores do paladar no CP e possível função com os transportadores de efluxo, usando como modelo a linha celular humana de CP (HIBCPP). Assim, temos como objetivos específicos:

- Analisar a expressão de um conjunto de recetores do paladar, com destaque para os recetores amargos (TAS2R) e de alguns transportadores ABC;
- Identificar ligandos dos TAS2R mais expressos, avaliando a sua resposta por “Ca²⁺ imaging”;
- Silenciar os TAS2R e avaliar, Ca²⁺ imaging, a especificidade de ligação dos compostos identificados aos TAS2R;
- Avaliar o efeito da ativação dos TAS2R pelos compostos amargos selecionados na função dos transportadores ABC.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultura Celular

Neste trabalho, foi utilizada uma linhagem celular de papiloma humano do plexo coróide (HIBCPP) (Ishiwata et al. 2005). As células foram mantidas em meio de cultura DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; PanBiotech) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Biochrom AG), 1% de antibiótico ampicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 5 µg/ml de insulina (Sigma-Aldrich), e incubadas a 37°C + 5% de CO₂ (NuAire).

De forma a assegurar uma expansão contínua da linha celular HIBCPP, e sempre que a cultura celular atingiu 80-90% de confluência, foi realizada passagem celular. Para tal, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Seguidamente, o PBS foi substituído por 0,25% tripsina-etilenodiamina tetra acético (tripsina-EDTA), num volume que assegura a cobertura total das células. Após 20 minutos de incubação a 37°C, adicionou-se um volume equivalente de meio de cultura, as células foram transferidas para um tubo de 50 mL (tipo *falcon*) e centrifugadas durante 10 minutos a 500 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio de cultura. Procedeu-se à contagem das células na suspensão celular, para a sua utilização nos ensaios seguidamente descritos e, parte desta suspensão foi colocada num novo frasco de cultura, na incubadora, de modo a dar continuidade aos estudos.

3.1.1. Contagem de Células

Para realizar a contagem das células, foram retirados 10 µL da suspensão celular aos quais se adicionou um volume igual de azul de tripano, seguido de homogeneização. Desta mistura, foram colocados 10 µL numa câmara de *Neubauer* e procedeu-se à contagem das células viáveis, tendo-se estimado o número de células através das seguintes expressões:

$$N^{\circ} \frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \text{Média de células}_{\text{quadrantes}} \times 2 \times 10^4 \quad (1)$$

$$N^{\circ} \text{ Total Células} = N^{\circ} \frac{\text{Células}}{\text{ml}} \times V_{\text{ressuspensão celular}} \quad (2)$$

O número de células necessário para cada ensaio experimental foi calculado, retirando o volume correspondente da suspensão celular e semeando as células em placas de cultura adequadas para cada ensaio.

3.2. Extração de RNA Total

Para analisar a expressão dos recetores do paladar nas células HIBCPP procedeu-se à extração de RNA total. Para tal, adicionou-se 1 mL TRIzol® (Sigma-Aldrich) por 10 cm² de área de cultura e homogeneizou-se de forma a provocar o rompimento das células e a dissolução de vários componentes celulares, seguido de incubação de 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionaram-se 200 µL clorofórmio/mL TRIzol®, homogeneizou-se a mistura por inversão, e as amostras foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente,

centrifugaram-se as amostras durante 15 minutos a 4°C e 12000 g. Após centrifugação, a solução separou-se em três fases: no fundo do tubo obteve-se a fase orgânica, que apresenta uma cor rosada, estando incluídos nesta fase as proteínas, o fenol e o clorofórmio; a interfase contém o DNA; e a fase aquosa, transparente, contém o RNA. Assim, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual se adicionaram 500 µL de isopropanol/mL TRIzol®, tendo-se misturado por inversão, de forma a permitir a recuperação do RNA por precipitação. Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 4°C durante 10 minutos a 12000 g, rejeitou-se o sobrenadante. O RNA, sob forma de precipitado branco (sedimento), foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 75% em água DEPC, centrifugando-se as amostras a 4°C durante 5 minutos a 7500 g, tendo-se rejeitado novamente o sobrenadante. Finalmente, o etanol excedente foi removido e o precipitado de RNA reidratado em água DEPC e armazenado a -80°C para uso posterior.

A quantificação do RNA foi realizada num nanoespectrofotômetro (Nanophotometer™, Implen) que, por leitura da absorvância a 260nm, fornece a concentração de RNA e a razão A260/A280, que indica o grau de pureza do RNA com base na absorvância a 260 nm e 280 nm, comprimentos de onda aos quais os ácidos nucleicos e as proteínas têm pico de absorção, respetivamente. Considera-se que o RNA apresenta boa qualidade e pureza quando a razão entre as absorvâncias se encontrar entre 1,8 e 2,1.

Para analisar a integridade do RNA, foi ainda realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1x corado com *GreenSafe* (NZYTech), agente intercalante de ácidos nucleicos. As amostras foram preparadas com 2 µL de amostra, 8 µL de H₂O DEPC e 1 µL de solução de deposição (10x) e depositadas no gel. Após a corrida da eletroforese, visualizou-se o gel num transiluminador UVITEC (UVitec Cambridge). A qualidade do RNA foi confirmada pela presença de 2 bandas de RNA ribossomal (rRNA), 18S e 28S, onde a banda 28S apresenta aproximadamente o dobro da intensidade da 18S.

3.3. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA (DNA complementar) consiste numa reação enzimática, pela ação da transcriptase reversa, que permite obter uma cadeia dupla de DNA complementar à sequência de RNA.

O RNA total foi inicialmente sujeito a um tratamento com a enzima DNase I (Sigma-Aldrich), de forma a eliminar possíveis vestígios de DNA genómico que possam estar presentes na amostra. Para isso, adicionou-se a um microtubo, um volume equivalente a 1 µg de RNA, 1 µL de reaction buffer 10x, 1 µL de DNase I e água DEPC até perfazer um volume final de 8 µL. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 37°C durante 15 minutos no termociclador (Multigene Optimax Labnet). Ao fim deste tempo, adicionou-se 1 µL de stop solution (EDTA),

de forma a quelatar os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e, deste modo, inativar a DNase I, seguido de um ciclo de 10 minutos a 70°C no termociclador.

Após o tratamento com a DNase I, para cada amostra prepararam-se duas MIX: na MIX1 foram adicionados 2 µL de *random primers* (NZYTech) e 1 µL de dNTPs (NZYTech); na MIX2 foram adicionados 2 µL de *buffer* e 1 µL de M-MLV (NZYTech). Posteriormente, a 500 ng de RNA foram adicionados 3 µL da MIX1 e água estéril até perfazer um volume total de 17 µL. Seguidamente, o microtubo foi colocado no termociclador durante 5 minutos a 65°C e adicionados 3 µL da MIX2, seguidos de 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C e 15 minutos a 70°C. O cDNA foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

3.4. Amplificação Enzimática de DNA do Produto da Transcrição Reversa (RT-PCR)

Para analisar a expressão dos genes que codificam os recetores do paladar, as moléculas da respetiva via de sinalização e alguns transportadores ABC, utilizou-se o método de Reação de Amplificação em cadeia do produto da transcrição reversa (RT-PCR - *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). A partir desta técnica é possível amplificar uma sequência específica de DNA, pela utilização de um par de oligonucleótidos iniciadores (*primers*), sendo que cada um deles é complementar a cada uma das extremidades da sequência a amplificar, em cadeias diferentes.

De forma a amplificar o cDNA dos genes em estudo (Tabela 5), realizaram-se reações de RT-PCR utilizando o kit *KAPA2G Fast ReadyMix PCR* (KAPA Biosystems). Por cada reação de 10 µL foram adicionados 5 µL da *mastermix*, 0,3 µL de cada *primer* (Direto e Reverso; 10 µM) e o restante de água estéril. Finalmente, foi adicionado 1 µL de cDNA, à exceção do negativo ao qual foi adicionado 1 µL de água estéril. A amplificação do cDNA foi realizada no termociclador, com o seguinte programa de amplificação: 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos de forma a desnaturar o DNA, 15 segundos na temperatura ótima de emparelhamento dos *primers*, e 10 segundos a 72°C. Para finalizar, as reações foram expostas a 72°C durante 5 minutos, para o preenchimento de todas as extremidades coesivas. Seguidamente, visualizaram-se os produtos amplificados, através de eletroforese em gel de agarose 1% ou 1,5% (fragmentos de tamanho inferior a 150pb), na presença de *GreenSafe*, utilizando um marcador de peso molecular apropriado (*NZYDNA Ladder VIII* e *GRS 50bp*, respetivamente).

Os produtos de PCR devidamente amplificados foram enviados para sequenciação à empresa StabVida (Portugal), e as sequências correspondentes aos genes em estudo foram confirmadas através do programa NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), por comparação com as sequências da base de dados de *Homo sapiens*.

Tabela 5 - Sequência dos *primers* utilizados. pb - pares de base.

| Gene | Tamanho do fragmento (pb) | Primer | | Temperatura de Hibridação (°C) |
|---------|---------------------------|---------|-----------------------------|--------------------------------|
| TAS2R1 | 1334 | Direto | 5'-TCCCAGCTGTCTGAAGGTGT-3' | 58 |
| | | Reverso | 5'-GCCTGAAGGGGACATGTTGTA-3' | |
| TAS2R3 | 1035 | Direto | ATCAGGGCTGCCTAATTGCT | 58 |
| | | Reverso | GTCCTGTAGTCTTGAGCCAGG | |
| TAS2R4 | 823 | Direto | TGTTTCGGTTATTCTATTTCTCTGC | 58 |
| | | Reverso | CCTGGAGAGTAAAGGGTGGC | |
| TAS2R5 | 937 | Direto | ACTACCAGGGGATCTGACCTC | 60 |
| | | Reverso | CCGAGCACACACTGTCTTCC | |
| TAS2R7 | 900 | Direto | GCAGGTGTGGATGTCAAATC | 58 |
| | | Reverso | ATGACTTGAGGGGTAGATTAGAGC | |
| TAS2R8 | 897 | Direto | TGTTTCAGTCTGCAGATAACATC | 58 |
| | | Reverso | GCATTCTGACAAATGTCTGCC | |
| TAS2R9 | 947 | Direto | GCATGCCAAGTGCAATAGAGG | 58 |
| | | Reverso | GGGTCTCTATGGAACAAAAGGCT | |
| TAS2R10 | 876 | Direto | GCTACGTGTAGTGGAAGGCA | 58 |
| | | Reverso | TGCAGTACCCTCAAAGAGGC | |
| TAS2R13 | 1607 | Direto | GCTAGGGCTCAGCAGAGAAAT | 58 |
| | | Reverso | GGCAAGTCCAAACTTCCCTAAT | |
| TAS2R14 | 924 | Direto | TGGGTGGTGTCTATAAGAGCAT | 58 |
| | | Reverso | CTGAGGGCTCCCCATCTTTG | |
| TAS2R16 | 909 | Direto | GTCCAGGAAGACACTTTGGAGT | 58 |
| | | Reverso | TAGGCCTAGCACTTTCCCTT | |
| TAS2R38 | 1141 | Direto | TTTCTGCACTGGGTGGCAA | 58 |
| | | Reverso | GGCATATTTATGAAGACTCACAGGC | |
| TAS2R39 | 930 | Direto | TCTGCGATCCTGCAGAAAGT | 58 |
| | | Reverso | GATGAAGTCGAAGCTGAAGCC | |
| TAS2R40 | 1015 | Direto | TCTTGGCGCAGAAACCTGAA | 58 |
| | | Reverso | TTCCAGTCACAGAGTCTGCC | |
| TAS2R41 | 833 | Direto | GCAGCGAATGGCTTCATTGT | 60 |
| | | Reverso | AACAGGAGCTGCGAGAACAC | |
| TAS2R44 | 900 | Direto | TTTTTCCAGTGTGGTAGTGGTTCT | 58 |
| | | Reverso | GATGAAGGCTTCTCTCCTTTCACC | |
| TAS2R48 | 952 | Direto | GAACAAGTGTTACTAAGCCTGC | 58 |
| | | Reverso | CTTCTTTCACCTCAGCGTGCA | |
| TAS2R50 | 963 | Direto | ACAACCAGTGATATTAGGCTTGC | 58 |
| | | Reverso | TCAGGTCTTTTACTCAGCACCT | |
| TAS2R60 | 864 | Direto | TCCTTTTACGCCTGGTAGCAA | 58 |
| | | Reverso | AGGAACGACGACTCTTCAGC | |
| Gnat3 | 1106 | Direto | CACCACAAGATGGGAAGTGGA | 58 |
| | | Reverso | ACATGAGCAAGAGTGGAAGAGA | |
| PlcB2 | 3911 | Direto | CAAAGAGGAACGCTTGGCAC | 58 |
| | | Reverso | ACCCTCCAGGTGAGGAAACT | |
| Abcc4 | 105 | Direto | TGTGGCTTTGAACACAGCGTA | 58 |
| | | Reverso | CCAGCACACTGAACGTGATAA | |
| Abcc1 | 82 | Direto | CGACATGACCGAGGCTACATT | 58 |
| | | Reverso | AGCAGACGATCCACAGCAAAA | |

3.5. Imunocitoquímica

A técnica de imunocitoquímica permite avaliar a expressão de proteínas, assim como, conhecer a sua localização e distribuição celular. As células HIBCPP foram semeadas numa placa contendo uma lamela por poço, e incubadas a 37°C + 5% CO₂ até atingirem 60-70% de confluência. Posteriormente, lavaram-se as lamelas com PBS 1x e fixaram-se as células com PFA 4% durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS 1x, as células foram incubadas em solução de permeabilização e bloqueio (Triton X-100 0,5% + BSA 1% em PBS) durante 1 hora. As lamelas foram então transferidas dos poços para a tampa da placa após várias lavagens com PBS-T (*Phosphate Buffered Saline* - *Tween*) 0,1%. Seguidamente, incubaram-se durante a noite, a 4°C, com o respetivo anticorpo primário (Tabela 6), diluído em solução de diluição de anticorpos (PBS-T 0,01% BSA 1%). Após este período, as células foram lavadas com PBS-T 0,01% e incubadas com o anticorpo secundário durante 1 hora à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, procedeu-se à marcação do núcleo utilizando *Hoechst* 33343 (1:1000, Molecular Probes) durante 10 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Por fim, procedeu-se à montagem das lâminas utilizando meio de montagem (Dako) e observou-se no microscópio confocal LSM 710 (Carl Zeiss), numa objetiva de 63x.

Por cada experiência, foram sempre realizados 2 controlos negativos: um para verificar a especificidade do anticorpo primário, no qual este foi omitido; outro para analisar a possível autofluorescência das células, no qual foram omitidos ambos os anticorpos primário e secundário.

Após otimização das condições e visualização dos recetores em estudo nas células HIBCPP, estudou-se a respetiva localização membranar (apical, basolateral ou ambas). Para tal, procedeu-se à co-localização dos recetores do paladar com o transportador ABCC1, anteriormente descrito como marcador basolateral no plexo coroide, na linha celular em estudo (Bernd et al. 2015). Para isso, semearam-se células da linha celular HIBCPP em *inserts* PET (tamanho do poro 0,4 µm, VWR). Durante os 7 dias em que as células foram cultivadas, procedeu-se a medição da sua TEER. Ao fim deste tempo, procedeu-se ao protocolo de imunocitoquímica anteriormente descrito. Para visualizar a localização dos recetores em estudo, foram obtidos em diversos campos do *insert*, vários *z-stacks* com cerca de 0.5 µm de espessura, com uma objetiva de 63x. Por fim, através da vista ortogonal foi realizada a análise da localização dos recetores do paladar, sendo considerada basolateral quando a marcação coincide com a marcação do ABCC1, e apical, quando a marcação incide no lado oposto.

Tabela 6 - Anticorpos primários e anticorpos secundários utilizados na imunocitoquímica.

| Anticorpo primário | Péptido | Diluição | Referência | Marca comercial |
|------------------------------------|---------|----------|-------------|--------------------------------|
| Rabbit anti-TAS2R4 | - | 1:300 | OSR00153W | ThermoFisher |
| Rabbit anti-TAS2R5 | - | 1:300 | OSR00154W | |
| Rabbit anti-TAS2R10 | - | 1:300 | PA5-39708 | |
| Rabbit anti-TAS2R14 | - | 1:300 | PA5-39710 | |
| Rabbit anti-TAS2R39 | - | 1:300 | PA5-39711 | |
| Rabbit anti-TAS1R1 | - | 1:100 | sc-50308 | Santa Cruz Biotechnology, Inc. |
| Rabbit anti-TAS1R2 | - | 1:100 | sc-50306 | |
| Goat anti-Tas1R3 | Sim | 1:100 | sc-22458 | |
| Rabbit anti-PlcB2 | Sim | 1:100 | sc-395 | Abcam |
| Rabbit anti-TrpM5 | Sim | 1:500 | AB104566 | |
| Rabbit anti-Gnat3 | Sim | 1:100 | sc-206 | |
| Anticorpo secundário | | Diluição | Referência | Marca comercial |
| Goat Alexa Fluor® 488 Anti-Rabbit | | 1:1000 | A-11008 | Molecular Probes® |
| Chicken Alexa Fluor® 647 Anti-Goat | | 1:750 | A-21449 | Molecular Probes® |
| Donkey Cy3 Anti-Rat | | 1:800 | 712-165-153 | Jackson ImmunoResearch |

3.6. Western Blot

A técnica de *Western blot* tem como principal intuito a avaliação da expressão de uma proteína num extrato total preparado a partir de tecidos ou células. Assim, a presença de várias proteínas envolvidas na via de sinalização do paladar, no CP de humano, foi avaliada por *Western blot*.

Para preparação dos extratos de proteína total, recolheram-se células da linha celular HIBCPP. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x, centrifugadas durante 7 minutos a 11000g, 4°C, rejeitando-se de seguida o sobrenadante. Este processo foi repetido duas vezes, e no final, as células foram ressuspensas em tampão de lise RIPA (5 mM HEPES (pH 7,5), 250 mM sucrose, 10 mM NaNO₃, 0,2 mM PMSF, 25 µg/mL Leupeptina, 1 mM ortovanadato, 10 mM fosfato de sódio (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2% Triton X-100, 2% desoxicolato, 0,2% SDS e 0,2 mM PMSF). A concentração total de proteína nas amostras foi determinada por utilização do Kit *Pierce™ BCA Protein Assay*, (Thermo Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante.

Efetuuou-se a preparação do gel de poliacrilamida, constituído por um gel de resolução (12,5%) e um gel de deposição (4.7%). Fez-se a mistura para o gel de resolução 12,5%, à qual se adicionou PSA 10% (persulfato de amónio; iniciador da polimerização) e TEMED (catalisador),

homogeneizou-se suavemente e verteu-se entre as placas de vidro, previamente montadas. Após polimerização, preparou-se do mesmo modo uma mistura para o gel de deposição 4,7% e verteu-se por cima do gel de resolução colocando o pente de imediato, sem deixar quaisquer bolhas de ar. As amostras foram preparadas com 25 µg de proteína total e solução de deposição (Glicerol, 10% SDS, Tris-HCl 1.5M, azul de bromofenol, 4% β-mercaptoetanol). Procedeu-se à desnaturação das amostras, a 95°C durante 10 minutos, à sua deposição nos poços e corrida a 220 V.

Após a eletroforese, procedeu-se à eletrotransferência. O gel de resolução foi colocado em tampão de eletrotransferência durante 10-15 minutos para equilibrar, assim como a membrana de PVDF (0,45 µm de poro; Millipore, Merck), depois de ativada em metanol absoluto durante alguns segundos. Montou-se a *sandwich* pela ordem seguinte: papel de filtro, membrana, gel, e novamente papel de filtro - e colocou-se no sistema Bio-Rad Turbo (Bio-Rad) durante 30 minutos a uma amperagem constante de 25 V. Após a eletrotransferência a membrana foi passada em TBS 1X (*Tris-Buffered Saline*) e colocada em solução de bloqueio (leite magro 5%, TBS 1X) durante 1-2 horas, à temperatura ambiente, com agitação. Seguidamente, a membrana foi incubada com o respetivo anticorpo primário, durante a noite, a 4°C. No dia seguinte, efetuaram-se 3 lavagens com TBS-T (*Tris-Buffered Saline - Tween*) 0,01% durante 15 minutos e incubou-se 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (anti-rabbit, 1:40 000, Santa Cruz Biotechnology), seguido de 2 lavagens de 10 minutos com TBS-T 0,01%. Finalmente, a membrana foi revelada utilizando ECL no sistema ChemiDoc (Bio-Rad).

3.7. Calcium Imaging

A técnica de *calcium imaging* foi utilizada para avaliar alterações nos níveis de Ca^{2+} intracelular das células HIBCPP, após aplicação de um estímulo. Esta técnica envolve a utilização de sondas (moléculas fluorescentes) que respondem à ligação de iões de Ca^{2+} por alteração das suas propriedades de fluorescência. Dentro das sondas possíveis para este efeito, escolheu-se a sonda Fura-2AM. Esta sonda é excitável no ultravioleta e, quando o Ca^{2+} se encontra no estado livre, a fluorescência a 380 nm é maior do que a 340 nm. Quando ligada ao Ca^{2+} , a sua fluorescência a 380 nm diminui e a 340 nm aumenta.

Para a realização desta técnica, foram semeadas 50000 células HIBCPP em placas 8 µ-slide (Ibidi). Após 4 a 5 dias, com uma confluência de 70-80%, as células foram lavadas 2 vezes com DMEM/F12, e carregadas com 5 µM Fura-2AM (Invitrogen) e 0.02% de ácido plurónico (Pluronic® F-127, Invitrogen) em DMEM/F12. O ácido plurónico é usado de forma a facilitar a solubilização da sonda. Após 1 hora de incubação, as células foram lavadas com solução de Tyrodes (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 1.0 mM, CaCl_2 2 mM, Na-piruvato 10 mM, glucose 10 mM, HEPES 10 mM, NaHCO_3 5 mM, pH 7.4), e incubadas durante mais 30 minutos com essa mesma solução. Ao fim desse tempo, colocaram-se as células sob um microscópio de

fluorescência de luz invertida (Axio Imager A1, Carl Zeiss), aplicaram-se os estímulos e registaram-se os resultados. A concentração de cálcio intracelular foi avaliada quantificando a razão da fluorescência emitida a 520 nm após excitação alternada a 340 nm e 380 nm, usando um aparelho Lambda DG4 (Sutter Instruments, Novato, CA, EUA) e um filtro passa-banda de 520 nm (Carl Zeiss, Alemanha) com uma objetiva 40x (Carl Zeiss, Alemanha), uma camera AxioVision e software (Carl Zeiss, Alemanha).

De forma a analisar a ativação dos recetores do paladar, na linha celular HIBCPP, foram realizados estímulos com diferentes concentrações de resveratrol, entre 25 e 250 μ M.

3.8. Ensaio MTT

O ensaio de MTT foi realizado com o objetivo de analisar de que forma o resveratrol poderá comprometer a viabilidade da linha celular HIBCPP. Este ensaio baseia-se na redução do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol, 2-yl)-2,5-diphenyl-212 *tetrazolium bromide*] sob a forma de cristais de formazano, de cor púrpura, que ao serem dissolvidos absorvem na região do visível, podendo desta forma ser quantificados por espectrofotometria. A quantificação da redução de MTT constitui um método colorimétrico para avaliar a viabilidade celular.

Para proceder a este ensaio, semearam-se cerca de 10 000 células por poço em placas de 96 poços, e incubaram-se a 37°C+5% CO₂. Quando as células atingiram uma confluência de 60-70%, estas foram incubadas durante 24h com diferentes concentrações de resveratrol (0-250 μ M). O procedimento foi sempre realizado em triplicado, e para cada experiência tiveram-se em conta os controlos necessários para o ensaio: branco (sem células), controlo negativo (células sem tratamento com o resveratrol) e controlo positivo (células + lixívia). Após as 24h, o meio de cultura foi removido, adicionaram-se 50 μ L de MTT e incubou-se a 37°C durante 2-4 horas (ao escuro). Seguidamente, adicionaram-se 200 μ L de DMSO para dissolver os cristais de formazano e agitou-se a placa durante 30 minutos. Para finalizar, 80 μ L de cada poço foram transferidos para uma nova placa nova e registaram-se as absorvâncias a 570 nm.

3.9. Transfecção

De forma a analisar a especificidade da ativação dos recetores TAS2R14 e TAS2R39 nas células HIBCPP, procedeu-se ao silenciamento da sua expressão através do uso de RNAs de interferência (siRNA) direcionados para cada um dos recetores. Assim, as células HIBCPP foram transfectadas com Silencer® Select siRNAs (Ambion, ThermoFischer) para o TAS2R14 e o TAS2R39. Numa fase inicial, as condições de transfecção foram otimizadas, tendo-se testado diferentes concentrações de siRNA e diferentes tempos entre a transfecção e os ensaios experimentais (24h-72h). As células foram semeadas em placas 8 μ -slide (Ibidi). Quando atingiram uma confluência de aproximadamente 60% e, 24h antes de iniciar a transfecção, o meio de cultura foi trocado para meio sem antibiótico. Para a transfecção testou-se: 10, 15 e 20 nM siRNA, TAS2R14 (s27144, ThermoFischer) ou TAS2R39 (s48942, ThermoFischer), e 5 nM

de lipofectamina 2000 (Thermo Fisher) em meio Opti-MEM (Invitrogen). Após 48 e 72h da transfeção foi realizada uma imunocitoquímica para avaliar a expressão de cada um dos recetores. Como controlos, foram incubadas células com lipofectamina e os siRNAs em separado. Os ensaios foram feitos pelo menos em duplicado. Após optimização das condições de transfeção foram realizados ensaios de *calcium imaging* com o estímulo de resveratrol, após a transfeção dos siRNAs nas células HIBCPP. Para a análise dos níveis intracelulares de cálcio foi também testado o silenciamento de ambos os recetores em simultâneo (10 nM). Como controlo da especificidade do siRNA de TAS2R14 ou TAS2R39, utilizou-se um siRNA *scramble* (4390843, ThermoFisher) a 10 nM.

3.10. Ensaios de *Uptake*

Os ensaios de *uptake* foram realizados para determinar a funcionalidade dos transportadores ABCC1, ABCC4 e ABCG2, na linha HIBCPP, na presença do composto resveratrol.

Para optimização do protocolo, utilizou-se o *Hoechst 33342*, marcador nuclear, e conhecido substrato do ABCG2 (Scharenberg et al. 2002). Para isso, as células da linha celular HIBCPP foram semeadas em placas de 96 poços e cultivadas durante 9 dias. Em seguida, as células foram lavadas com *Krebs Ringer Buffer* (KRB), seguido de incubação com o *Hoechst 33342* durante 90 minutos a 37°C e lavagem das células, 3 vezes, com KRB gelado. De seguida, as células foram lavadas e lisadas com 1% Triton X-100 em KRB durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, a fluorescência do substrato *Hoechst 33342* foi medida num Fluorímetro de Microplaca (350/480 nm).

3.11. Estudos de Permeabilidade

Os estudos de permeabilidade foram realizados com o intuito de analisar o transporte molecular através de uma camada de células HIBCPP. De modo a definir o tempo de cultura necessário para que as células estabeleçam as características da BSLCR, foi medida, nas culturas, a resistência elétrica transepitelial (TEER) com o medidor EVOM2 (WPI), ao longo do tempo. Além disto, foi ainda realizado o ensaio de permeabilidade celular *Lucifer Yellow* (LY). Para tal, as células HIBCPP com uma densidade de 3×10^5 células/cm² foram cultivadas em *inserts* de cultura celular PET (tamanho do poro 0,4 µm, VWR), com e sem revestimento de colagénio. O ensaio LY foi realizado ao 7º dia de cultura, tendo em conta os valores de TEER ($\geq 40 \Omega\text{cm}^2$) e a observação das células (estabelecimento de monocamada) microscopicamente. O meio de cultura foi substituído por tampão de Krebs e, no compartimento apical foi adicionado LY numa concentração final de 0.1 mg/mL. Incubaram-se as culturas 1h a 37°C e recolheram-se amostras de ambos os compartimentos (apical e basolateral), as quais foram transferidas para microplacas pretas de 96 poços e medida a fluorescência num leitor de microplacas (*Lucifer Yellow*: 405/535 nm).



Figura 8 - Sistema de filtro *transwell* padrão ou invertido. Adaptado de (Schwerk et al. 2012).

3.12. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa *GraphPad Prism*. Para a comparação das médias entre três ou mais grupos foi utilizado o teste *one-way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett* ou *Bonferroni's*, sendo que os dados foram expressos em média \pm SEM. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1. Expressão dos Recetores do Amargo (TAS2R), das Moléculas Efetoras da Via de Sinalização e dos Transportadores ABC na Linha Celular HIBCPP

4.1.1. Análise da Expressão Génica por RT-PCR

A técnica de RT-PCR permitiu analisar a expressão, ao nível do mRNA, dos seguintes genes: 13 TAS2R (Figura 9), uma molécula efetora da via de sinalização do paladar (TrpM5) (Figura 10) e três transportadores ABC (Figura 11), na linha celular humana de CP, HIBCPP.

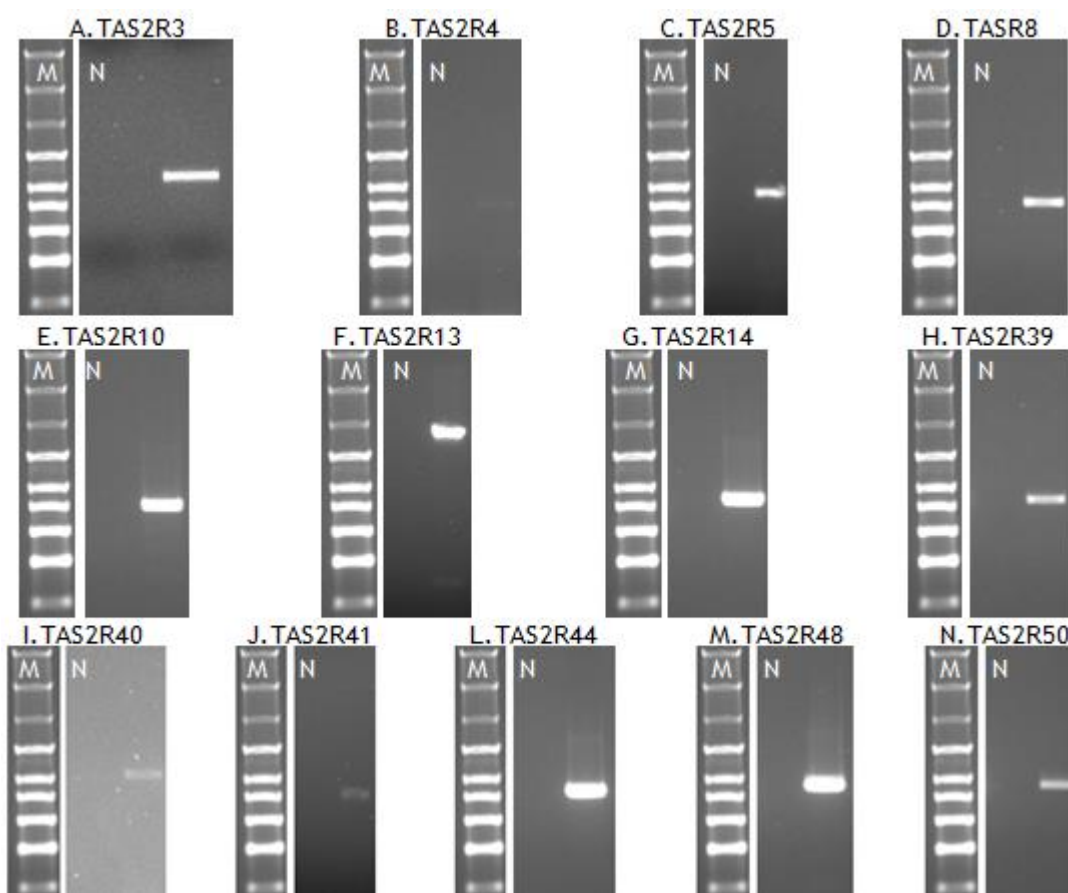


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com *GreenSafe*, dos produtos de RT-PCR, realizado com cDNA de HIBCPP. A - TAS2R3 (~1035 pb); B - TAS2R4 (~823 pb); C - TAS2R5 (~937 pb); D - TAS2R8 (~897 pb); E - TAS2R10 (~876 pb); F - TAS2R13 (~1607 pb); G - TAS2R14 (~924 pb); H - TAS2R39 (~930 pb); I - TAS2R40 (~1015 pb); J - TAS2R41 (~833 pb); L - TAS2R44 (~900 pb); M - TAS2R48 (~952 pb); N - TAS2R50 (~963 pb). M: Marcador molecular (*NZYtech*, *DNA Ladder VIII*); N: controlo negativo sem cDNA.

Como ilustrado na figura 9, obtiveram-se produtos de amplificação com os tamanhos previstos para os genes TAS2R3, TAS2R4, TAS2R5, TAS2R8, TAS2R10, TAS2R13, TAS2R14, TAS2R39, TAS2R40, TAS2R41, TAS2R44, TAS2R48, TAS2R50. No controlo negativo, reação de PCR sem cDNA, não se observou amplificação, indicando ausência de contaminação com DNA exógeno.

Estes produtos amplificados foram ainda sequenciados, pela empresa StabVida (Portugal) e as sequências foram analisadas através da ferramenta informática NCBI-BLAST, por comparação com as sequências da base de dados de *Homo sapiens*. A sequência dos transcritos foi confirmada com uma percentagem de homologia superior ou igual a 96% (Tabela 7).

Tabela 7 - Percentagem de homologia dos recetores do paladar sequenciados neste trabalho, por comparação com a base de dados de *Homo sapiens* (NCBI-BLAST).

| Recetor | Homologia (%) |
|---------|---------------|
| TAS2R4 | 99 |
| TAS2R5 | 97 |
| TAS2R8 | 99 |
| TAS2R10 | 99 |
| TAS2R13 | 96 |
| TAS2R14 | 99 |
| TAS2R39 | 100 |
| TAS2R41 | 96 |
| TAS2R44 | 99 |
| TAS2R48 | 99 |
| TAS2R50 | 99 |

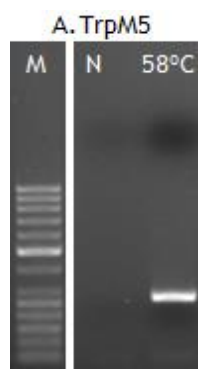


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com *GreenSafe*, dos produtos de RT-PCR, realizado com cDNA de HIBCPP. A - TrpM5 (~167 pb). M: Marcador molecular (*GRS 50bp*); N: controlo negativo.

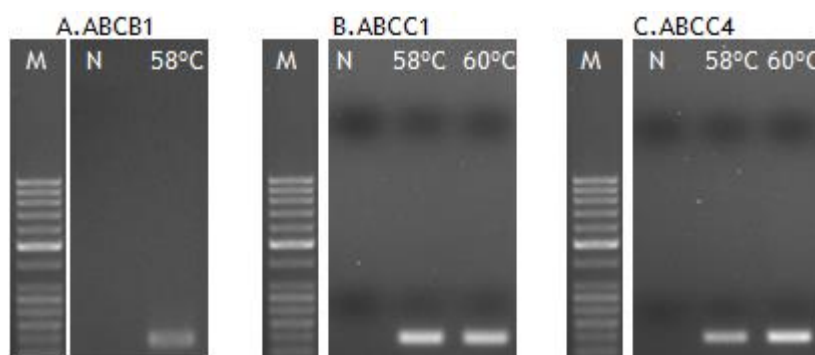


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com *GreenSafe*, dos produtos de RT-PCR, realizado com cDNA de HIBCPP. A - ABCB1 (~105 pb); B - ABCC1 (~82 pb); C - ABCC4 (~105 pb). M: Marcador molecular (*GRS 50bp*); N: controlo negativo.

4.1.2. Análise da Expressão Proteica por *Western Blot*

Após confirmação da expressão génica de alguns recetores TAS2R, de acordo com os anticorpos disponíveis, analisou-se a expressão proteica de cinco destes (TAS2R4, TAS2R5, TAS2R10, TAS2R14 e TAS2R39) por *Western blot*. Assim, foram obtidas bandas com um peso molecular de aproximadamente 34 a 40 kDa, para os TAS2R estudados: TAS2R4, TAS2R5, TAS2R10 e TAS2R39 (Figura 12). Para o recetor TAS2R14 não foi possível obter qualquer banda.

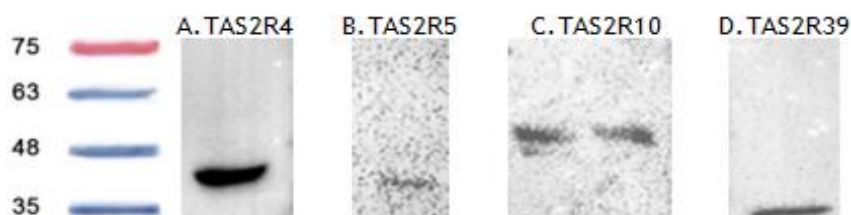


Figura 12 - *Western blot* de extratos de proteína total da linha celular HIBCPP. A - TAS2R4 (~34 kDa); B - TAS2R5 (~35 kDa); C - TAS2R10 (~35 kDa); D - TAS2R39 (~38 kDa).

A expressão proteica das moléculas efetoras (TrpM5 e PlcB2) também foi analisada por *Western blot*, tendo-se obtido bandas com um peso molecular de aproximadamente 115 kDa (Figura 13).

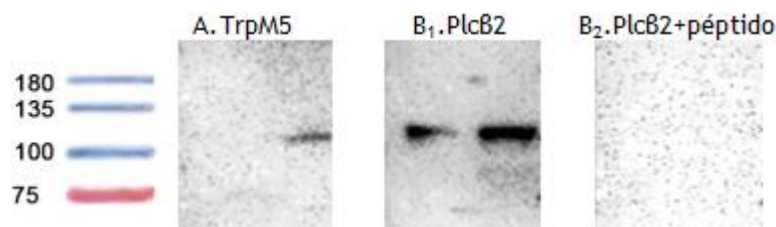


Figura 13 - *Western blot* de extratos de proteína total da linha celular HIBCPP. A - TrpM5 (~110 kDa); B₁ - PlcB2 (~115 kDa); B₂ - PlcB2 + péptido (~35 kDa).

4.1.3. Imunocitoquímica

A expressão e localização de alguns recetores do paladar (TAS2R4, TAS2R5, TAS2R10, TAS2R14 e TAS2R39), na linha celular HIBCPP, foi também analisada por imunocitoquímica, após incubação com o respetivo anticorpo primário e visualização por microscopia de confocal.

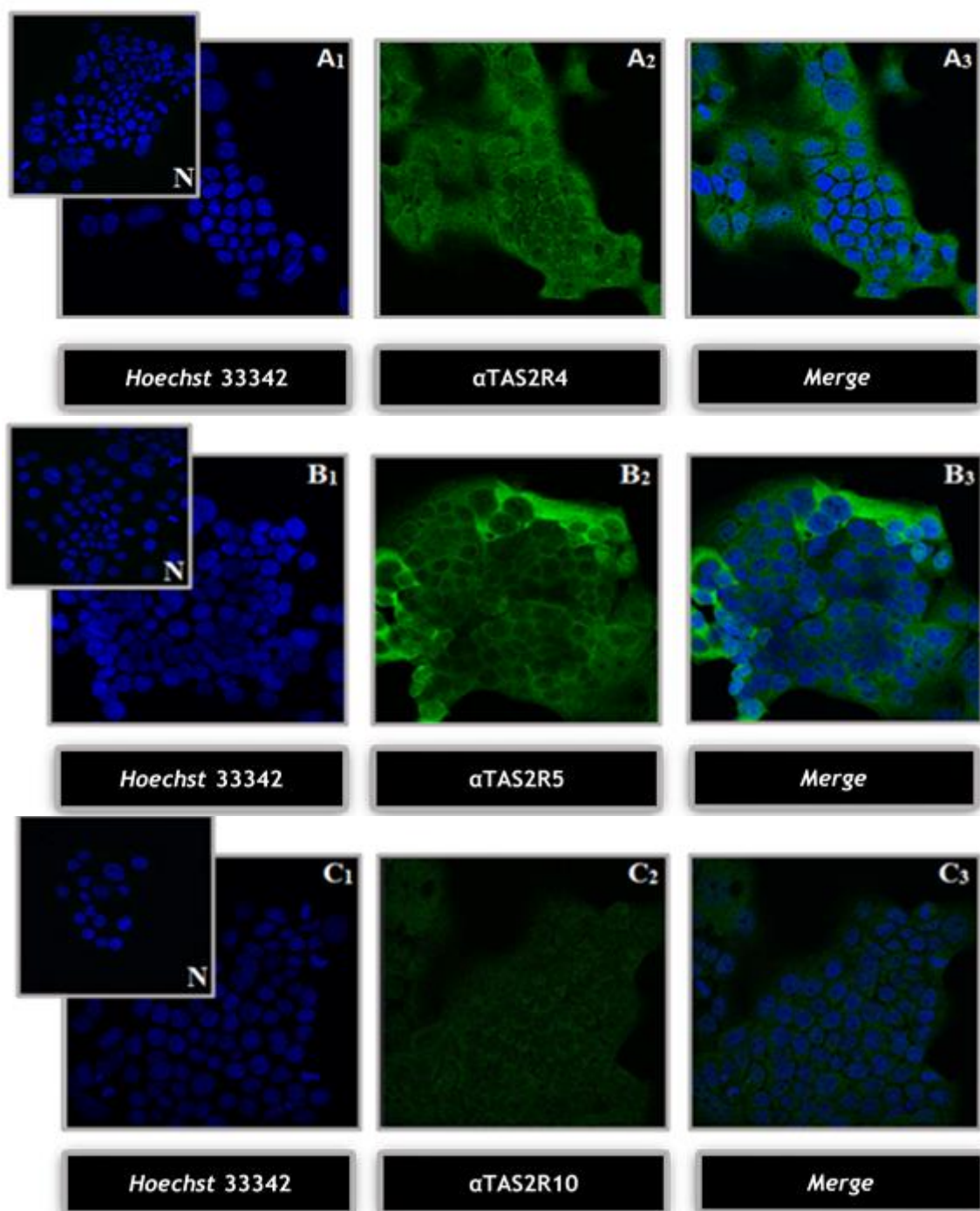


Figura 14 - Expressão de alguns recetores amargos, no CP da linha celular HIBCPP, por microscopia confocal. A₁₋₃ - TAS2R4; B₁₋₃ - TAS2R5; C₁₋₃ - TAS2R10. N: controlo negativo.

Nas Figuras 14 (A-C) e 15 (A-B), pode-se observar a marcação citoplasmática celular para todos os recetores. Para os respetivos controlos (N) não se verificou qualquer marcação usando os mesmos parâmetros de aquisição

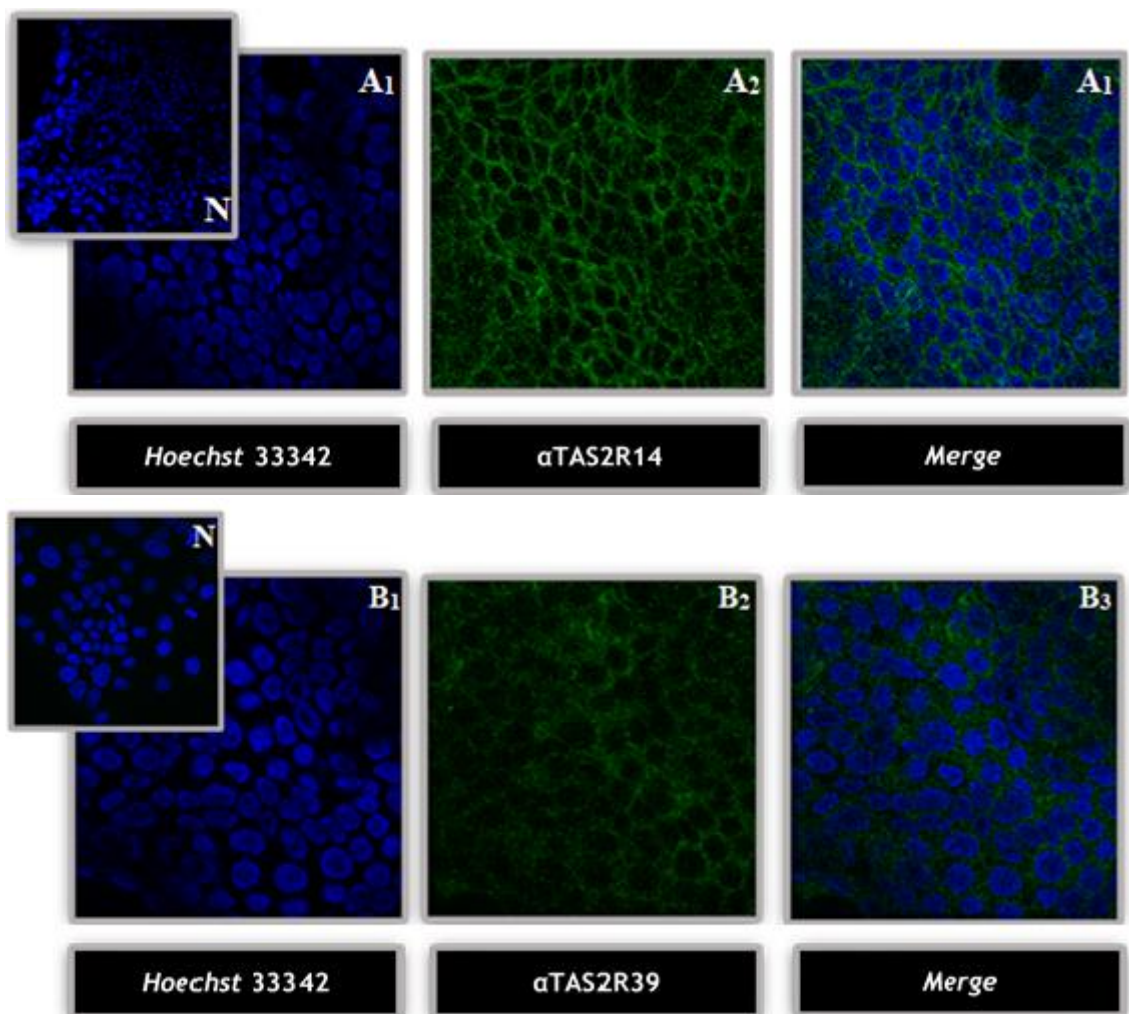


Figura 15 - Expressão de alguns recetores amargos, no CP da linha celular HIBCPP, por microscopia confocal. A₁₋₃ - TAS2R14; B₁₋₃ - TAS2R39. N: controlo negativo.

Para estudar a localização membranar (apical, basolateral ou ambas) dos recetores do paladar, procedeu-se à co-localização com o transportador ABCC1, descrito como marcador basolateral no plexo coróide. A figura 16 ilustra a co-localização dos recetores TAS2R4, TAS2R14 e TAS2R39.

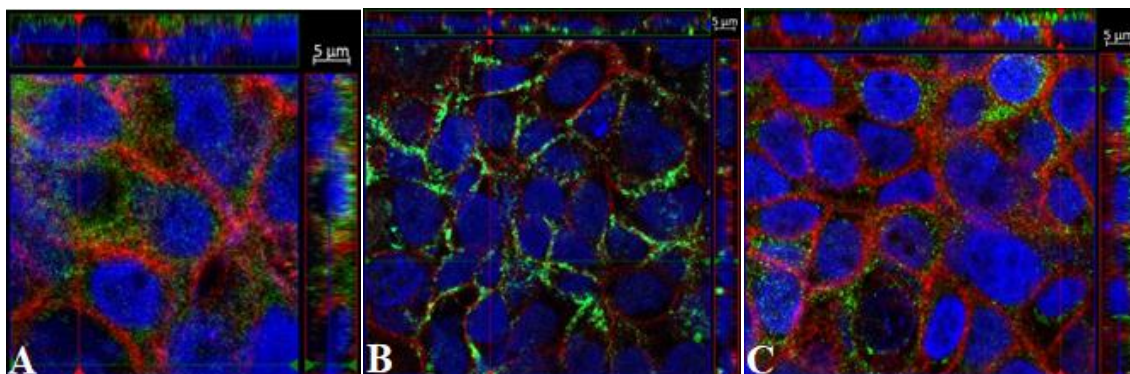


Figura 16 - Co-localização dos recetores TAS2Rs com o transportador ABCC1. A - TAS2R4; B - TAS2R14; C - TAS2R39. TAS2Rs marcados a verde, ABCC1 marcado a vermelho e núcleos marcados a azul.

4.2. Viabilidade Celular

O ensaio de MTT foi realizado com o objetivo de analisar de que forma o resveratrol, ligando selecionado para os estudos de ativação dos TAS2R, poderá comprometer a viabilidade da linha celular HIBCPP. Para isso, as células foram incubadas com o resveratrol durante 24 horas, tendo-se obtido os seguintes resultados (Figura 17).

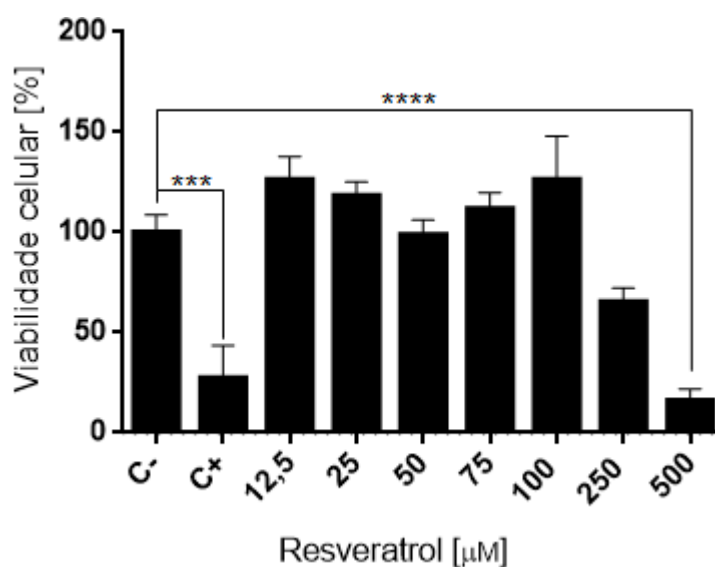


Figura 17 - Viabilidade celular com incubação de resveratrol durante 24h. *One-way ANOVA* seguido por teste de *Dunnett* foi usado para a análise estatística relativamente ao controlo negativo. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ e os gráficos de barras representam médias \pm SEM com um $n = 2$. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

4.3. Ensaios de “Single Cell Calcium Imaging” na Linha Celular HIBCPP: Resposta ao Resveratrol

A técnica de Ca^{2+} imaging foi utilizada para estudar a resposta das células HIBCPP ao resveratrol. Este composto foi selecionado por se tratar de um composto amargo descrito por outros autores (Tabela 4) como ligando de dois TAS2R que provámos terem grande expressão no CP (TAS2R14 e TAS2R39). Inicialmente, testámos uma gama de concentrações de resveratrol (25 - 250 μM) (Figura 18).

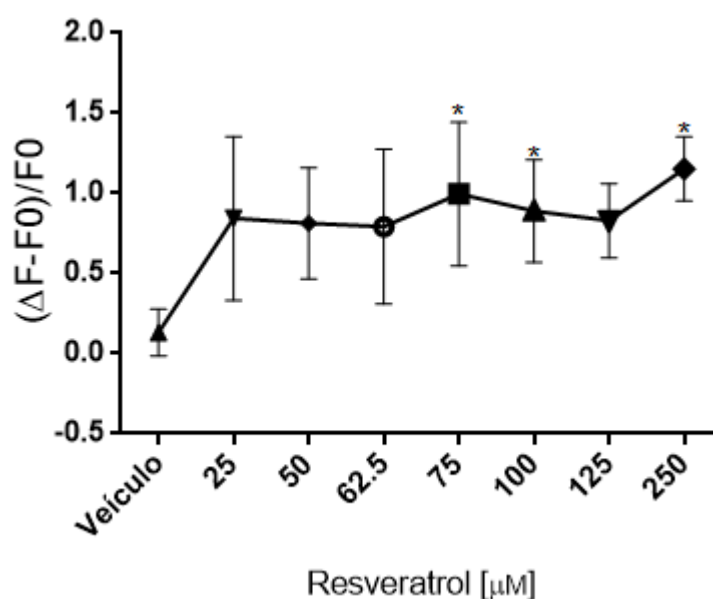


Figura 18 - Variação do Ca^{2+} intracelular na linha celular HIBCPP após estímulo com resveratrol. A variação da fluorescência é a razão entre o F_{380} e o F_{340} ($\Delta F = F_{380}/F_{340}$), F_0 corresponde à linha base de fluorescência, células marcadas com Fura-2AM e estimuladas com diferentes concentrações de resveratrol (25 - 250 μM). *One-way ANOVA* seguido por teste de *Dunnett* foi usado para a análise estatística relativamente ao veículo (controlo, 1% de DMSO). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ e os gráficos de barras representam médias \pm SEM com um $n \geq 3$. * $p < 0.05$.

4.4. Silenciamento do TAS2R14 e TAS2R39

Como mencionado anteriormente, o resveratrol é um ligando conhecido dos recetores TAS2R14 e TAS2R39. Assim, para avaliar a especificidade da ligação do resveratrol a estes recetores, procedeu-se ao seu silenciamento, com siRNAs, nas células HIBCPP. Numa fase inicial, foram testados diferentes parâmetros de otimização para a transfecção com siRNAs nestas células: volumes do agente de transfecção (lipofectamine 2000, ThermoFischer), concentrações de siRNA (10, 15 e 20 nM) e tempos entre a transfecção e os ensaios (24h, 48 e 72h). A avaliação dos resultados do silenciamento foi realizada por ensaios de imunocitoquímica. A fluorescência foi obtida a partir de 15 imagens visualizadas por microscopia confocal, tendo-se comparado a fluorescência de cada uma das condições com a fluorescência do ensaio só com a lipofectamine. Com base nos resultados obtidos na

imunocitoquímica, chegaram-se às seguintes condições: 10 nM de siRNA, 5 nM de lipofectamine 2000 e 72h de tempo de incubação, tendo-se obtido os resultados apresentados na figura 19.

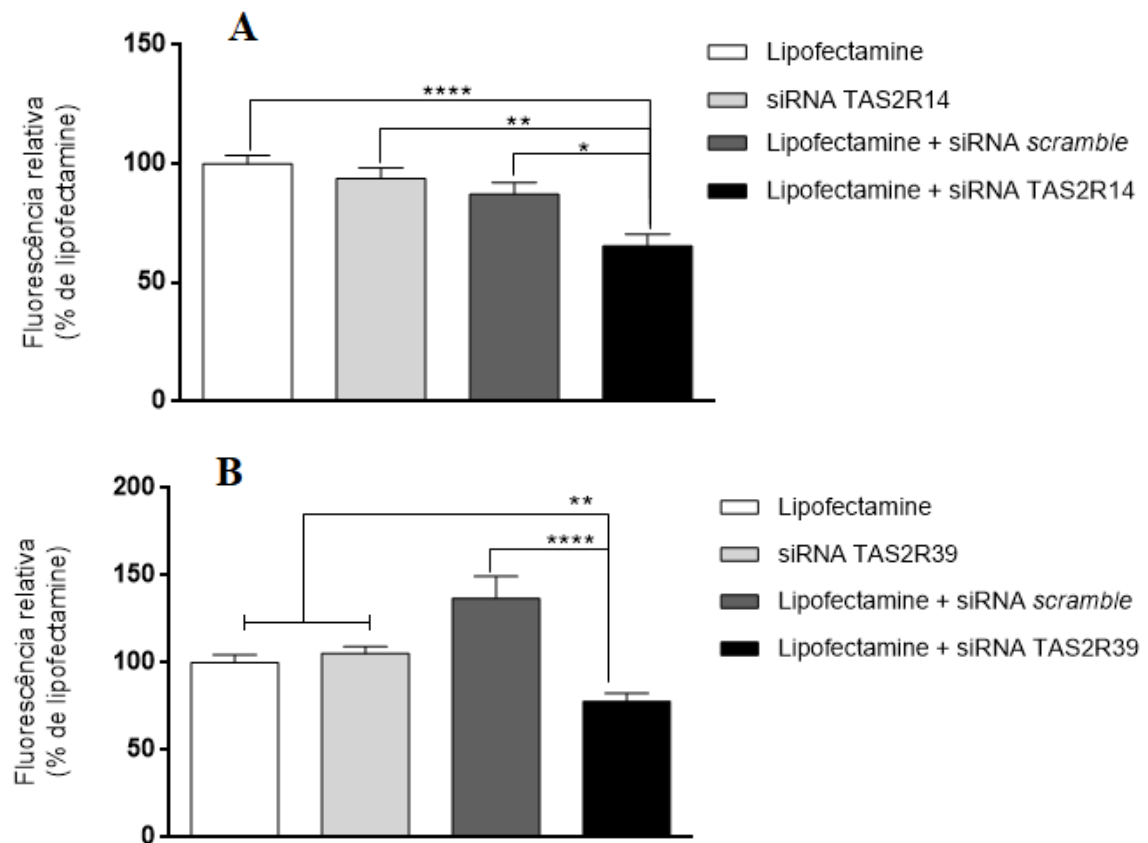


Figura 19 - Silenciamento dos recetores TAS2R14 e TAS2R39. Fluorescência relativa obtida por imunocitoquímica, a partir de 15 campos visuais, após silenciamento com 10 nM de siRNA e 5 nM de lipofectamine 2000. **A** - Quantificação da fluorescência no controlo (lipofectamine e siRNA TAS2R14) e nas células transfetadas (*scramble* e siRNA TAS2R14). **B** - Quantificação da fluorescência no controlo (lipofectamine e siRNA TAS2R39) e nas células transfetadas (*scramble* e siRNA TAS2R39). *One-way ANOVA* seguido por teste de *Bonferroni's* foi usado para a análise estatística. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ e os gráficos de barras representam médias \pm SEM de 15 campos visuais. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

Procedeu-se então aos ensaios funcionais, avaliando a resposta ao resveratrol, por “Ca²⁺ imaging”, após silenciamento de cada um dos TAS2R (TAS2R14 e TAS2R39) e dos 2 em conjunto.

As condições testadas estão indicadas na figura 20 e os resultados preliminares apresentados correspondem a n=1 ou n=2.

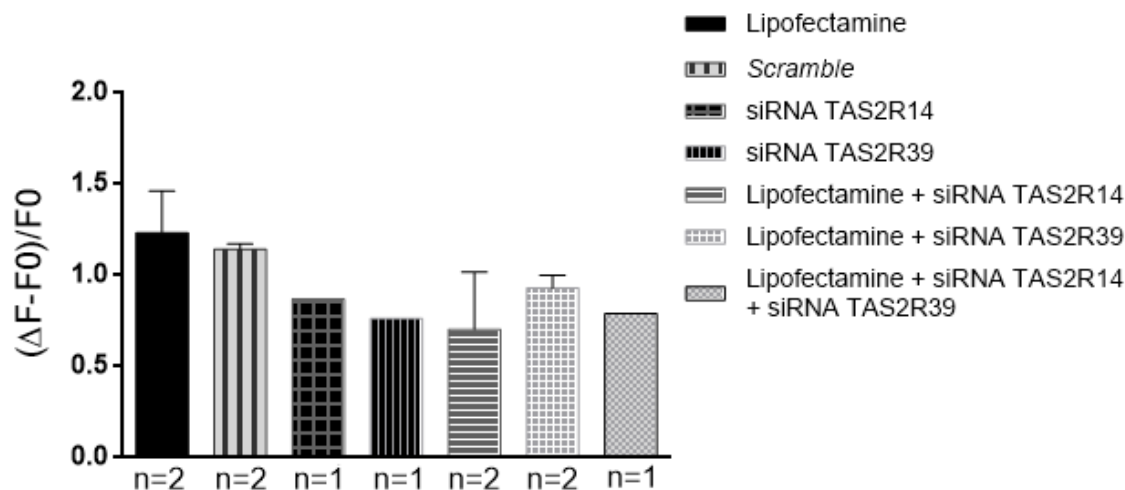


Figura 20 - Variação do Ca^{2+} intracelular na linha celular HIBCPP após silenciamento dos recetores TAS2R14 e TAS2R39. O silenciamento foi efetuado com 10 nM de siRNA e 5 nM de lipofectamine 2000. A variação da fluorescência é a razão entre o F_{380} e o F_{340} ($\Delta F = F_{380}/F_{340}$), F_0 corresponde à linha base de fluorescência, células marcadas com Fura-2AM e estimuladas com 100 μM de resveratrol. Os gráficos de barras representam médias \pm SEM.

4.5. Ensaios de *Uptake*

De modo a garantirmos a funcionalidade dos transportadores ABC na linha celular HIBCPP, começamos por otimizar as condições das experiências de “*uptake*”. Esta otimização tem como objetivo a realização de ensaios, com substratos e bloqueadores específicos, que nos permitirão elucidar os mecanismos de ação do resveratrol e a sua relação com os TAS2R e transportadores. Começamos por testar o protocolo, através do composto *Hoechst* 33342, já identificado como substrato do ABCG2 (Scharenberg et al. 2002). Para isso, testámos quatro condições diferentes, duas concentrações de substrato (1 μM e 0,5 μM), um controlo (sem substrato) e um branco (ausência de células). A fluorescência foi medida num fluorímetro de microplaca, de acordo com o comprimento de onda de excitação e emissão do *Hoechst* 33342 (350/480 nm). Aos valores da fluorescência foi subtraído o branco, obtendo-se os valores representados no gráfico da figura 21.

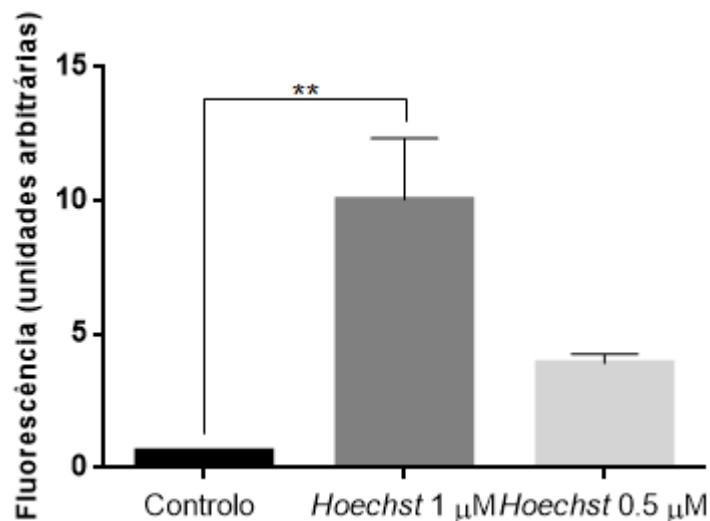


Figura 21 - Validação do ensaio de *uptake* nas células HIBCPP. Comparação dos níveis de *uptake* do substrato *Hoechst* 33342, através da medição da intensidade média de fluorescência, com diferentes concentrações (1 µM e 0,5 µM). *One-way ANOVA* seguido por teste de *Dunnnett* foi usado para a análise estatística relativamente ao controlo. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ e os gráficos de barras representam médias \pm SEM com um $n=3$. ** $p < 0.01$.

4.6. Medição da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER) e Estudos de Permeabilidade

Com o objetivo de realizar estudos de permeabilidade, começamos por otimizar o estabelecimento de uma monocamada impermeável de células HIBCPP. Durante um período de crescimento das células (8 dias), procedeu-se a medição da respetiva TEER, como pode ser observado pela figura 22. O oitavo dia de crescimento das células não é demonstrado no gráfico devido aos valores da TEER serem semelhantes aos do sétimo dia.

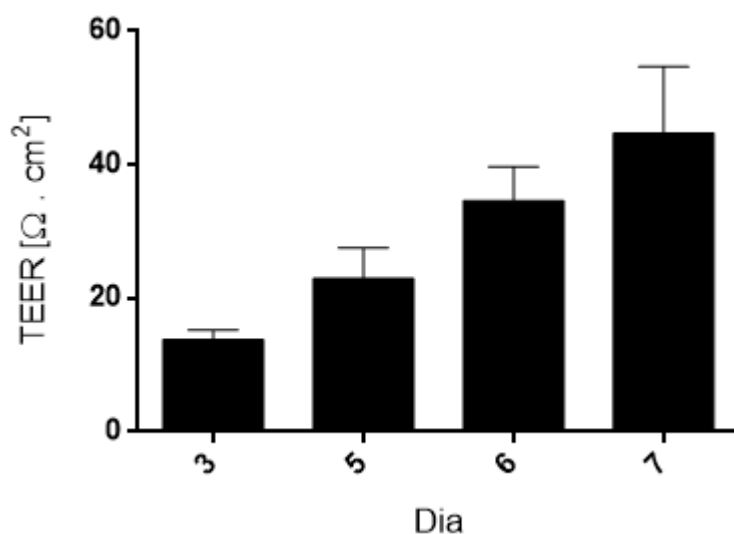


Figura 22 - Medição da TEER a partir do 3 dia de crescimento da linha celular HIBCPP. Os gráficos de barras representam médias \pm SEM com um $n \geq 3$.

Para avaliar a permeabilidade das células, começamos por utilizar o ensaio *lucifer yellow*, tendo-se testado 4 condições diferentes, *inserts* com colagénio e sem revestimento de colagénio, um controlo (apenas *lucifer yellow*) e um branco (ausência de células e *lucifer yellow*). O meio do compartimento basolateral de cada um dos *inserts* em estudo, é recolhido para uma microplaca preta, efetuando-se a medição da sua fluorescência num fluorímetro de microplaca, de acordo com o comprimento de onda de excitação e emissão do *lucifer yellow* (405/535 nm). Às fluorescências medidas é subtraído o branco obtendo-se os resultados observados na figura 23.

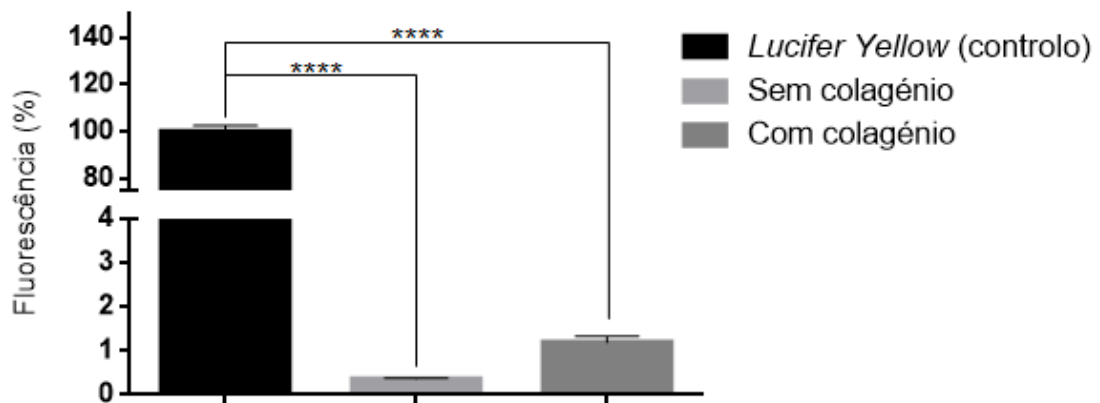


Figura 23 - Ensaio de permeabilidade do *Lucifer Yellow* (LY) das células HIBCPP. Avaliação da permeabilidade da linha celular HIBCPP, utilizando *inserts* revestidos com colagénio e sem revestimento de colagénio. *One-way ANOVA* seguido por teste de *Dunnett* foi usado para a análise estatística relativamente ao controlo. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ e os gráficos de barras representam médias \pm SEM com um $n=3$. **** $p < 0.0001$.

5. Discussão

No presente trabalho, a via de sinalização do paladar, anteriormente descrita no CP de rato (Tomás et al. 2016), foi pela primeira vez estudada em CP humano, concretamente na linha celular de papiloma humano de CP (HIBCPP) (Ishiwata et al. 2005). Começámos por demonstrar a presença dos recetores do amargo (TAS2R), de moléculas de sinalização da via do paladar e de alguns transportadores ABC, usando ensaios de RT-PCR, *Western blot* e imunocitoquímica. Assim, na linha HIBCPP, confirmámos a presença de transcritos para 13 recetores do amargo (TAS2R3, TAS2R4, TAS2R5, TAS2R8, TAS2R10, TAS2R13, TAS2R14, TAS2R39, TAS2R40, TAS2R41, TAS2R44, TAS2R48 e TAS2R50), uma molécula de sinalização (TrpM5) e 3 transportadores de efluxo (ABCB1, ABCC1 e ABCC4). A expressão proteica foi analisada por *Western blot*, confirmando-se a presença dos recetores do amargo (TAS2R4, TAS2R5, TAS2R10, TAS2R14 e TAS2R39) e das moléculas de sinalização (TrpM5 e PlcB2). Para os recetores do amargo observaram-se valores de peso molecular dentro dos referenciados pelo fabricante dos anticorpos (34 - 40 kDa), enquanto que, o TrpM5 e a PlcB2 exibiram valores de pesos moleculares mais baixos do que o esperado. O TrpM5 apresentou um peso molecular de 115 kDa em vez de 130 kDa. Para a PlcB2 foi obtido um peso de 110 kDa e o valor esperado era de 140 kDa. O bloqueio pela utilização do péptido, permitiu provar a especificidade da ligação do anticorpo primário, à PlcB2, confirmando a presença desta proteína da via de sinalização do paladar. A expressão dos recetores TAS2R4, TAS2R5, TAS2R10, TAS2R14 e TAS2R39 foi ainda demonstrada por imunocitoquímica. Dado que a nossa hipótese de estudo propõe que os recetores do paladar possam funcionar como sensores da composição química do sangue e/ou LCR, é fundamental avaliar a sua localização nas células epiteliais do CP (luminal e basolateral). Para responder a esta questão refizemos ensaios de imunocitoquímica onde se marcou simultaneamente um recetor TAS2R e o transportador ABCC1, cuja localização se sabe ser basolateral (Strazielle & Ghersi-Egea 2015). A observação das lâminas, no microscópio confocal, permitiu-nos observar a co-localização dos recetores TAS2R4, TAS2R14 e TAS2R39 com o ABCC1, tendo-se verificado que o TAS2R4 e o TAS2R39 se encontram, maioritariamente na membrana apical e o TAS2R14 na membrana basolateral.

Como já referido anteriormente, os recetores TAS2Rs são responsáveis por reconhecer compostos amargos. Existe uma grande variedade de compostos com potencial terapêutico que ligam a estes recetores, sendo um deles o resveratrol, descrito como ligando dos TAS2R14 e TAS2R39 (Roland et al. 2013), recetores que provámos estarem presentes nas células HIBCPP. Avaliámos a resposta das células HIBCPP ao resveratrol por medição das alterações no cálcio intracelular com os ensaios de Ca^{2+} *imaging*. Começámos por testar concentrações de 1 mM e 500 μM , observando-se um grande aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Com isto, decidimos testar concentrações mais baixas de resveratrol (25 a 250 μM), tendo obtido respostas da mesma ordem de grandeza. Com base nestes resultados, escolhemos utilizar uma concentração de resveratrol de 100 μM , para os ensaios de silenciamento, visto ser uma concentração intermédia entre as testadas, e já referenciada noutros estudos do mesmo tipo

(Nakamura & Ookura 2016). Com base nos resultados do MTT verificou-se que esta concentração, 100 μ M, não afeta a viabilidade das células HIBCPP.

Com o intuito de demonstrar que a resposta observada no ensaio de Ca^{2+} *imaging*, se deve à ativação dos recetores TAS2R14 e TAS2R39 procedeu-se ao seu silenciamento com siRNAs específicos. Os resultados da fluorescência mostraram o silenciamento, uma vez que tanto para o TAS2R14 como para o TAS2R39 observámos uma diminuição da emissão de fluorescência, estatisticamente significativa, após silenciamento com o respetivo siRNA. Deste modo, pudemos prosseguir para os ensaios funcionais, medindo as respostas de Ca^{2+} intracelular ao resveratrol antes e depois do silenciamento dos recetores TAS2R14 e TAS2R39. Até ao momento, obtivemos apenas resultados preliminares, pelo que ainda não é possível retirar conclusões, foram realizados apenas um ou dois ensaios (n=1; n=2). Contudo, os resultados parecem mostrar uma tendência para diminuição das respostas, de Ca^{2+} intracelular, nas células transfetadas com os respetivos siRNAs para o TAS2R14 e TAS2R39 comparativamente aos controlos (lipofectamina e siRNA *scramble*).

Os transportadores ABCs são um componente essencial na função da barreira sangue-LCR, pois protegem o cérebro de compostos endógenos e exógenos, incluindo compostos terapêuticos (Flores et al. 2017). A relação entre a via do paladar e a regulação do transporte mediado pelos transportadores ABC foi já descrito noutros sistemas. Nomeadamente, um estudo realizado em células do intestino, demonstrou que o TAS2R38 ativa o ABCB1, após estimulação com um agonista (Jeon et al. 2011). Contudo, até ao momento, no CP ainda não foi estudada a regulação dos transportadores de efluxo pelos recetores do paladar. Um dos objetivos deste trabalho pretendia avaliar os efeitos da ativação destes recetores, em resposta à estimulação com o resveratrol, na função dos transportadores de efluxo. Embora não tenha sido possível avançar para os estudos de *uptake* e permeabilidade, nas células HIBCPP, foi possível estabelecer e validar os protocolos para o fazer num futuro próximo. Para tal, foram realizados ensaios de *uptake*, utilizando um substrato conhecido do transportador ABCG2, o *Hoechst 33342*. Em relação aos estudos de permeabilidade, tal como os ensaios de *uptake*, houve necessidade de otimizar o protocolo, tendo-se utilizado o ensaio *lucifer yellow (LY)* para avaliar a permeabilidade através de uma monocamada de células HIBCPP. Para a realização destes estudos, são necessários *inserts*, onde são semeadas células durante um período de 7-8 dias. Após 3-4 dias de incubação, é realizada a medição da TEER, todos os dias, até ao oitavo dia de crescimento. Em comparação com outros estudos (Bernd et al. 2015), onde verificaram que apenas as culturas com uma TEER superior a 150 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ apresentavam uma resistência adequada para os estudos de permeação, verificámos que as nossas culturas com uma TEER de 40 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ manifestava características de barreira. Para confirmar que estamos perante uma monocamada impermeável de células, procedeu-se à incubação com o LY, no compartimento apical. Foi depois medida a fluorescência do LY no compartimento basolateral, sendo esta muito inferior à do composto no compartimento

apical, mostrando assim que não houve passagem/transporte do LY. A percentagem de fluorescência foi ~1%, que com base noutros estudos (Schwerk et al. 2012), é indicador de formação de barreira por parte das células.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

A realização deste trabalho permitiu confirmar a expressão dos recetores TAS2R, moléculas efetoras da via de sinalização do paladar, bem como a presença dos transportadores, na linha celular de CP humano. Demonstrámos a capacidade das células epiteliais de CP responderem aos compostos amargos, mais concretamente, ao resveratrol. Os estudos de silenciamento com os siRNAs, específicos para os TAS2R14 e TAS2R39, indicam-nos que a resposta de Ca^{2+} *imaging* parece dar-se, pelo menos em parte, na ativação do TAS2R14 e TAS2R39. Esta resposta por parte das células epiteliais de CP, poderá indicar que o CP atue na vigilância química de determinados compostos, presentes no sangue e/ou no LCR, que poderão controlar transportadores de efluxo presentes na barreira sangue-LCR. Num futuro próximo, pensamos testar estímulos com concentrações mais baixas de resveratrol, silenciar os recetores TAS2R14 e TAS2R39 e concluir os estudos de *uptake* e permeabilidade, para avaliar os efeitos do resveratrol na funcionalidade dos transportadores de efluxo.

7.Referências Bibliográficas

- Adler, E. et al., 2000. A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell*, 100(6), pp.693-702.
- Ahmed, F. et al., 2016. Bitter taste receptors: Extraoral roles in pathophysiology. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 77, pp.197-204.
- Berman, A.Y. et al., 2017. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precision Oncology*, 1.
- Bernd, A. et al., 2015. Characterization of efflux transport proteins of the human choroid plexus papilloma cell line HIBCPP, a functional in vitro model of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Pharmaceutical Research*, 32(9), pp.2973-2982.
- Bill, B.R. & Korzh, V., 2014. Choroid plexus in developmental and evolutionary perspective. *Frontiers Neuroscience*, 8, pp.1-11.
- Blanchette, M. & Daneman, R., 2015. Formation and maintenance of the BBB. *Mechanisms of Development*, 138, pp.8-16.
- Bourassa, P., Bariyanga, J. & Taymir-Riahi, H.A., 2013. Binding sites of resveratrol, genistein, and curcumin with milk α - and β -caseins. *Journal of Physical Chemistry*, 117(5), pp.1287-1295.
- Bugde, P. et al., 2017. The therapeutic potential of targeting ABC transporters to combat multi-drug resistance. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(5), pp.511-530.
- Carluccio, M.A. et al., 2003. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(4), pp.622-629.
- Chandrashekar, J. et al., 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *NATURE*, 444(7117), pp.288-294.
- Chodobski, A. & Szmydynger-chodobska, J., 2001. Choroid Plexus: Target for polypeptides and site of their synthesis. *Microscopy Research and Technique*, 52(1), pp.65-82.
- Choi, O. et al., 2014. Construction of Artificial Biosynthetic Pathways for Resveratrol Glucoside Derivatives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), pp.614-618.
- Chung, S. et al., 2011. Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), pp.79-90.
- Clark, A.A. et al., 2015. TAS2R bitter taste receptors regulate thyroid function. *FASEB*

- Journal*, 29(1), pp.164-172.
- Cygankiewicz, A.I. et al., 2014. Molecular Basis of Taste Sense: Involvement of GPCR Receptors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(6), pp.771-780.
- D. Kikut-Ligaj and J. Trzcielinska-Lorych, 2016. How taste works: cells, receptors and gustatory perception. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 20(5), pp.699-716.
- Damkier, H.H., Brown, P.D. & Praetorius, J., 2010. Epithelial Pathways in Choroid Plexus Electrolyte Transport. *Physiology*, 25(4), pp.239-249.
- Daniel, H. & Rubio-aliaga, I., 2003. An update on renal peptide transporters. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 284(5), pp.885-892.
- Emerich, D.F. et al., 2005. The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *Bioessays*, 27(3), pp.262-274.
- Flores, K., Manautou, J.E. & Renfro, J.L., 2017. Gender-specific expression of ATP-binding cassette (Abc) transporters and cytoprotective genes in mouse choroid plexus. *Toxicology*, 386, pp.84-92.
- Foster, S.R. et al., 2013. Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart. *PLOS One*, 8(5), p.e64579.
- Gentiluomo, M. et al., 2018. Taste receptor polymorphisms and male infertility. *Human Reproduction*, 32(11), pp.2324-2331.
- Gilca, M. & Dragos, D., 2017. Extraoral Taste Receptor Discovery: New Light on Ayurvedic Pharmacology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- Hladky, S.B. & Barrand, M.A., 2014. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids barriers CNS*, 11(1), pp.1-32.
- Ishimaru, Y., 2009. Molecular mechanisms of taste transduction in vertebrates. *Odontology*, 97(1), pp.1-7.
- Ishiwata, I. et al., 2005. Establishment and characterization of a human malignant choroids plexus papilloma cell line (HIBCPP). *Human cell*, 18(1), pp.67-72.
- Janssen, S.F. et al., 2013. Gene Expression and Functional Annotation of the Human and Mouse Choroid Plexus Epithelium. *PLOS ONE*, 8(12).
- Jeon, T.-I., Seo, Y.K. & Osborne, T.F., 2011. Gut Bitter Taste Receptor Signaling Induces

- ABCB1 through a Mechanism Involving CCK. *Biochemical Journal*, 438(1), pp.33-37.
- Ji, M. et al., 2014. Identification of Novel Compounds for Human Bitter Taste Receptors. *Chemical Biology and Drug Design*, 84(1), pp.63-74.
- Kaji, I. et al., 2009. Secretory effects of a luminal bitter tastant and expressions of bitter taste receptors, T2Rs, in the human and rat large intestine. *American journal of physiology-Gastrointestinal and liver physiology*, 296(5), pp.971-981.
- Kaur, C., Rathnasamy, G. & Ling, E.-A., 2016. The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 75(3), pp.198-213.
- Kaur, M. & Badhan, R.K.S., 2015. Phytoestrogens Modulate Breast Cancer Resistance Protein Expression and Function at the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 18(2), pp.132-154.
- Keaney, J. & Campbell, M., 2015. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS Journal*, 282(21), pp.4067-4079.
- Krasteva, G. et al., 2011. Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 108(23), pp.9478-9483.
- Kundu, J.K. et al., 2006. Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF- κ B in mouse skin by blocking I κ B kinase activity. *Carcinogenesis*, 27(7), pp.1465-1474.
- Lee, R.J. et al., 2014. Bitter and sweet taste receptors regulate human upper respiratory innate immunity. *Journal of Clinical Investigation*, 124(3), pp.1393-1405.
- Lee, R.J. et al., 2012. T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *Journal of Clinical Investigation*, 122(11), pp.4145-4159.
- Lee, R.J. & Cohen, N.A., 2016. Taste Receptors in Innate Immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(2), pp.217-236.
- Lehtinen, M.K. et al., 2013. The Choroid Plexus and Cerebrospinal Fluid: Emerging Roles in Development, Disease, and Therapy. *Journal of Neuroscience*, 33(45), pp.17553-17559.
- Leonard, S.S. et al., 2003. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(4), pp.1017-1026.

- Levit, A. et al., 2014. The bitter pill: Clinical drugs that activate the human bitter taste receptor TAS2R14. *FASEB Journal*, 28(3), pp.1181-1197.
- Liu, X. et al., 2015. Expression of bitter taste receptor Tas2r105 in mouse kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(4), pp.733-738.
- Loo, T.W., Bartlett, M.C. & Clarke, D.M., 2013. Human P-glycoprotein Contains a Greasy Ball-and-Socket Joint at the Second Transmission Interface. *Journal of Biological Chemistry*, 288(28), pp.20326-20333.
- Lu, P. et al., 2017. Extraoral bitter taste receptors in health and disease. *Journal of General Physiology*, 149(2), pp.181-197.
- Matsunami, H., Montmayeur, J.-P. & Buck, L.B., 2000. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*, 404(6778), pp.601-604.
- Meyerhof, W. et al., 2010. The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors. *Chemical Senses*, 35(2), pp.157-170.
- Mortazavi, M.M. et al., 2014. The choroid plexus: a comprehensive review of its history, anatomy, function , histology, embryology, and surgical considerations. *Childs Nervous System*, 30(2), pp.205-214.
- Naderali, E.K., 2009. Obesity and cardiovascular dysfunction: A role for resveratrol? *Obesity Research and Clinical Practice*, 3(1), pp.45-52.
- Nair, M.S., 2015. Spectroscopic study on the interaction of resveratrol and pterostilbene with human serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 149, pp.58-67.
- Nakamura, S. & Ookura, T., 2016. Nutrients Modulate T1r2 Transcript Levels in MIN 6 and Primary Cultured Taste Buds Cells under High Glucose Condition. *Food and Nutrition Sciences*, 7, pp.312-319.
- Orsmark-Pietras, C. et al., 2013. Transcriptome analysis reveals upregulation of bitter taste receptors in severe asthmatics. *European respiratory journal*, 42(1), pp.65-78.
- Pydi, S.P., Bhullar, R.P. & Chelikani, P., 2012. Constitutively active mutant gives novel insights into the mechanism of bitter taste receptor activation. *Journal of Neurochemistry*, 122(3), pp.537-544.
- Quintela, T. et al., 2013. Analysis of the Effects of Sex Hormone Background on the Rat

- Choroid Plexus Transcriptome by cDNA Microarrays. *PLOS ONE*, 8(4).
- Quintela, T. et al., 2016. “ Smelling ” the cerebrospinal fluid: olfactory signaling molecules are expressed in and mediate chemosensory signaling from the choroid plexus. *FEBS Journal*, 283(9), pp.1748-1766.
- Quintela, T. et al., 2018. The choroid plexus harbors a circadian oscillator modulated by estrogens. *Chronobiology International*, 35(2), pp.270-279.
- Roland, W.S.U. et al., 2013. Bitter Taste Receptor Activation by Flavonoids and Isoflavonoids: Modeled Structural Requirements for Activation of hTAS2R14 and hTAS2R39. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44), pp.10454-10466.
- Roper, S.D. & Chaudhari, N., 2017. Taste buds: cells, signals and synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(8), pp.485-497.
- Rozengurt, E. & Sternini, C., 2007. Taste receptor signaling in the mammalian gut. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(6), pp.557-562.
- Santos, C.R.A. et al., 2017. The choroid plexus as a sex hormone target: Functional implications. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 44, pp.103-121.
- Sarkar, F.H. et al., 2010. Cellular signaling perturbation by natural products. *Cellular Signalling*, 21(11), pp.1541-1547.
- Saunders, N.R. et al., 2016. The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(7), pp.3210-3215.
- Saunders, N.R. et al., 2013. Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), pp.742-752.
- Scharenberg, C.W. et al., 2002. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*, 99(2), pp.507-512.
- Schutzer, S.E. et al., 2010. Establishing the proteome of normal human cerebrospinal fluid. *PLoS ONE*, 5(6), pp.1-7.
- Schwerk, C. et al., 2012. Polar invasion and translocation of neisseria meningitidis and streptococcus suis in a novel human model of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *PLoS ONE*, 7(1).

- Serlin, Y. et al., 2015. Anatomy and Physiology of the Blood-Brain Barrier. *Seminars in cell and developmental biology*, 38, pp.2-6.
- Shah, A.S. et al., 2009. Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science*, 325(5944), pp.1131-1134.
- Shair, I., He, W. & Yin, L., 2018. Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 100, pp.335-348.
- Shigemura, N. & Ninomiya, Y., 2016. *Recent Advances in Molecular Mechanisms of Taste Signaling and Modifying*, Elsevier Inc.
- Skipor, J. & Thiery, J.C., 2008. The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: Undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 68(3), pp.414-428.
- Snell, R., 2014. O Sistema Ventricular, o Líquido Cerebrospinal e as Barreiras Hematoencefálica e Hematoliquórica. In *Neuroanatomía Clínica*. pp. 377-401.
- Soares, S. et al., 2013. Different Phenolic Compounds Activate Distinct Human Bitter Taste Receptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(7), pp.1525-1533.
- Sodani, K. et al., 2012. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chinese journal of cancer*, 31(2), pp.58-72.
- Strazielle, N. & Ghersi-Egea, J.-F., 2015. Efflux transporters in blood-brain interfaces of the developing brain. *Frontiers in Neuroscience*, 9(21), pp.1-11.
- Sweeney, M.D., Sagare, A.P. & Zlokovic, B. V., 2015. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurovascular dysfunction in mild dementia and Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(7), pp.1055-1068.
- Tajes, M. et al., 2014. The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Molecular Membrane Biology*, 31(5), pp.152-167.
- Taniguchi, K., 2004. Expression of the Sweet Receptor Protein, T1R3, in the Human Liver and Pancreas. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(11), pp.1311-1314.
- Tellone, E. et al., 2015. Resveratrol: A Focus on Several Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
- Tietz, S. & Engelhardt, B., 2015. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions

- and adherens junctions. *Journal of Cell Biology*, 209(4), pp.493-506.
- Tomas, J. et al., 2016. "Tasting" the cerebrospinal fluid: Another function of the choroid plexus? *Neuroscience*, 320, pp.160-171.
- Tomás, J. et al., 2016. "Tasting" the cerebrospinal fluid: Another function of the choroid plexus? *Neuroscience*, 320, pp.160-171.
- Wolburg, H. & Paulus, W., 2010. Choroid plexus: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), pp.75-88.
- Wölfle, U. et al., 2015. Expression and functional activity of the bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R38 in human keratinocytes. *Skin Pharmacology and Physiology*, 28(3), pp.137-146.
- Wu, S.V., Chen, M.C. & Rozengurt, E., 2005. Genomic organization, expression, and function of bitter taste receptors (T2R) in mouse and rat. *Physiological Genomics*, 22(2), pp.139-149.
- Xu, J. et al., 2013. Functional characterization of bitter-taste receptors expressed in mammalian testis. *Molecular Human Reproduction*, 19(1), pp.17-28.
- Yamamoto, K. & Ishimaru, Y., 2013. Oral and extra-oral taste perception. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 24(3), pp.240-246.
- Yamazaki, T. et al., 2013. Activation of the hTAS2R14 Human Bitter-Taste Receptor by (-)-Epigallocatechin Gallate and (-)-Epicatechin Gallate. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(9), pp.1981-1983.
- Zhang, Y. et al., 2015. Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy. *AAPS Journal*, 17(4), pp.802-812.